

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía y Embriología Humana I



**ESTUDIO DE LAS BASES ANATÓMICAS DEL CARCINOMA  
DE COLON EN LA POBLACIÓN JUVENIL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Juan Pablo Flores Gutiérrez**

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

**Fermín Viejo Tirado**  
**M<sup>a</sup> José Blázquez Layunta**  
**Isabel Arenas Jiménez**

Madrid, 2013

©Juan Pablo Flores Gutiérrez, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA I**



**Estudio de las Bases Anatómicas  
del Carcinoma de Colon en la  
Población Juvenil**

**TESIS DOCTORAL**

**Juan Pablo Flores Gutiérrez**

**DIRECCIÓN:**

**Fermín Viejo Tirado  
M<sup>a</sup> José Blánquez Layunta  
Isabel Arenas Jiménez**

**Madrid, 2012**



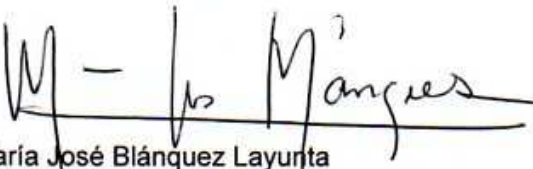
D<sup>a</sup> MARÍA JOSÉ BLÁNQUEZ LAYUNTA, Profesora Titular del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, D. FERMÍN VIEJO TIRADO, Profesor Titular del Departamento de Anatomía y Embriología Humana I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y D<sup>a</sup> ISABEL ARENAS JIMÉNEZ, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Alcalá de Henares, como Directores de la Tesis de D. JUAN PABLO FLORES GUTIÉRREZ

INFORMAN:

Que el trabajo titulado "Estudio de las Bases Anatómicas del Carcinoma de Colón en la Población Juvenil" reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral, y consideramos que su autor está capacitado para obtener el grado de Doctor, siempre y cuando así lo considere el Tribunal designado por la Universidad Complutense de Madrid para juzgar la memoria.

Firmado en Madrid a siete de marzo de dos mil doce

Los directores de la tesis

  
María José Blánquez Layunta

  
Fermín Viejo Tirado

  
Isabel Arenas Jiménez

## ***DEDICATORIA:***

a mis padres, **Juan Pablo y Cirila**,  
por apoyarme en mis decisiones y a lo largo de mi vida.

a mis hijos, **Erika Celina, Pablo Patricio, Dana Lizeth y Claudio Emiliano**,  
por estar siempre presentes en mis pensamientos y en cada tarea que emprendo.

## **AGRADECIMIENTOS:**

a los Profs. Drs. **Isabel Arenas, M<sup>a</sup> José Blázquez y Fermín Viejo**, directores de esta Tesis, por sus valiosas observaciones y desvelos para escribir este trabajo.

a las Dras. Med. **Oralia Barboza y Raquel Garza Guajardo**, amigas y colegas, por la paciencia y consejos durante nuestra práctica en el Hospital, y por su amistad personal y afecto.

a la Dra. **Natalia Vilches Cisneros**, por apoyarme y trabajar juntos en los inicios de esta investigación que al final se convirtió en la presente tesis, así como por su comprensión, ayuda y amistad incondicional.

al Dr. **Arturo Luevano González**, por la realización de los histoarreglos de Carcinoma de Colon y el análisis de los pacientes con síndrome de Lynch.

al MC **Arturo Quintanilla**, por el apoyo con los estudios de biología molecular y el análisis estadístico.

a **Josefina, Wendolyne y Mayela**, equipo de trabajo del Laboratorio de Inmunohistoquímica, por su trabajo y dedicación en los estudios y secciones histológicas.

a la **Dra. Inmaculada Santos**, por la minuciosa comprobación y corrección de todas las referencias y su valiosa ayuda en la maquetación del manuscrito.

a **Mis Residentes**, actuales y anteriores, por brindarme ideas y nuevos retos en el desarrollo de esta investigación.

a **Mis Profesores**, por inculcarme que cualquier tarea comienza con una idea y termina con cristalizarla y llevarla a la práctica diaria para nuestros compañeros y gremio.

Agradecer a los que me han ayudado a terminar a bien esta tesis incluye una lista interminable de **amigos, colegas y profesores** que se involucraron en el transcurso de esta tarea y muchas más durante mi vida, muchos de ellos ayudaron a forjar mis éxitos y a templar mi carácter.

<b>ABREVIATURAS</b>	9
<b>INTRODUCCIÓN</b>	12
Diferencias Anatómicas y Fisiológicas en Cáncer Colorrectal	16
Evidencia Anatómica, Embriológica y Fisiológica del CCR	17
Características de las Células Neoplásicas	19
1. Autosuficiencia en señales de crecimiento	23
2. Insensibilidad a los factores que regulan el crecimiento celular	24
3. Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)	25
4. Características adquiridas por las células neoplásicas	26
5. Angiogénesis sostenida	27
6. Invasión tisular y metástasis	28
Carcinogénesis	29
Mecanismos Epigenéticos en Carcinogénesis	31
Mecanismos Moleculares de Inactivación Epigenética	33
Mecanismos Epigenéticos en el CCR	35
Genes de Penetrancia Alta y Baja	36
Evidencia Epidemiológica del Cáncer Colorrectal en el Mundo y en el Hospital Universitario	36
Características Clinicomoleculares y Anatomopatológicas del CCR	39
Poliposis Familiar Adenomatosa (PFH)	39
Progresión Neoplásica en Carcinoma Colorrectal Esporádico	40
Reparación de Bases (MMR)	42
Inactivación de los Genes Asociados a la Reparación del ADN (MMR)	43
Inestabilidad Microsatelital	44
Cáncer Colorrectal Hereditario No Asociado a Pólipos (CCRNP)	45
Características Clínicas y Patológicas del Síndrome de Lynch	48
Diagnóstico de Pacientes con Síndrome de Lynch	49
Bases Moleculares del Síndrome de Lynch y Tumores Esporádicos con Diferencia de Mecanismos de Reparación de ADN (MMR)	50
Cáncer Colorrectal, IMS y BRAF. Características Histopatológicas en Pacientes Jóvenes	52
BRAF y Adenocarcinoma Colorrectal	57
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	58

<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	59
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	61
MATERIAL	62
Selección de Material para Estudio	62
Selección de Casos en Forma Retrospectiva	62
Selección de Material y Metodología de Estudio de CCR en Pacientes Menores de 50 años y Mayores de 50 Años	63
Selección de Material para Técnica Inmunohistoquímica y PCR en Pacientes Menores de 50 Años	64
Construcción de Histomatrices en Pacientes Mayores de 50 Años	65
Selección de Material para Extracción de ADN y PCR	66
Reactivos Utilizados	67
○ Ensayos de PCR	67
○ Detección de Proteínas en Ensayos de Inmunohistoquímica	67
○ Soluciones y Tampones Generales	67
MÉTODOS	68
Técnica Histológica para Muestras Incluidas en Parafina	68
Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E)	68
Técnica de Inmunohistoquímica	70
Interpretación de la Inmunorreacción y Controles	71
Procesamiento de Muestras para PCR	73
Aclaramiento del Tejido	73
Extracción de ADN	73
Detección de la Mutación BRAFv600E	74
PCR en Tiempo Real	74
Análisis de Inestabilidad Microsatelital	76
Detección de Deleciones o Duplicaciones en los Genes de la Reparación MLH1 y MSH2	78
Técnica de MLPA (Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification	78
○ Desnaturalización del ADN e Hibridación de las Sondas	78
○ Reacción de Ligación	78
Análisis Estadístico	79

---

<b>RESULTADOS</b>	80
Características Clínicas	81
Características Anatomopatológicas	83
Localización del Tumor	83
Tamaño Tumoral	86
Características Histopatológicas	86
Adenocarcinoma Variedad Intestinal	86
Adenocarcinoma Variedad Mucínosa y en Anillo de Sello	89
Análisis Inmunohistoquímico	95
Pacientes Jóvenes con Tumores Sincrónicos y Segundas Neoplasias con Criterios de Bethesda, Pérdida de la Reparación del ADN y Ausencia de Mutación en BRAFv600E	98
Resultados de la Selección de Casos en Forma Retrospectiva y Comparación con las Características Anatomopatológicas	101
Análisis de Mutación BRAF (v600E)	102
Pacientes Jóvenes con Tumores Sincrónicos y Alteraciones en MLH1/MSH2 y BRAFv600E	103
<b>DISCUSIÓN</b>	107
Epidemiología y Características Clinicopatológicas	108
Características Anatomopatológicas	109
Localización	109
Tamaño Tumoral y Estadio Clínico Astler y Coller	111
Histopatología	113
Lesiones Precursoras	114
Inmunohistoquímica: Proteínas Relacionadas con la Reparación del ADN	115
Análisis Mutacional BRAF	118
Pacientes Jóvenes con Tumores Sincrónicos y Segundas Neoplasias con Criterios de Bethesda, Pérdida de la Reparación del ADN y Ausencia de Mutación BRAFv600E	120
Pacientes Jóvenes con CCR Temprano, Criterios de Bethesda y Ausencia de Mutación BRAFv600E	121



<b>CONCLUSIONES</b>	124
<b>RESUMEN</b>	126
<b>SUMMARY</b>	129
<b>REFERENCIAS</b>	131

## ABREVIATURAS

<b>A:</b>	adenosina
<b>ADN:</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>ADNDT:</b>	Adenodesoxiribonucleotidodimetiltransferasa
<b>ALT:</b>	recombinación intercromosomal de secuencias de nucleótidos
<b>APC:</b>	gen poliposis adenomatosa colónica / Poliposis adenomatosa colónica
<b>ARN:</b>	Acido ribonucleico
<b>Bax,Bak,Bid,Bim:</b>	subfamilia de proteínas relacionadas con apoptosis
<b>Bcl1-XL,BclW:</b>	subfamilia de proteínas antiapoptóticas
<b>Bcl2:</b>	proteína relacionada con apoptosis
<b>BRAF:</b>	oncogén relacionado con la familia de las cinasas
<b>BRAFv600:</b>	mutación de la región v600 BRAF
<b>BRCA1:</b>	gen relacionado con el carcinoma de mama familiar
<b>BUB:</b>	tirosinasa serina treonina de control mitótico
<b>CAM's.:</b>	moléculas de adhesión celular
<b>CCR:</b>	carcinoma colorrectal
<b>CCRNP:</b>	cáncer colorrectal no polipósico
<b>CCRNP:</b>	carcinoma colorrectal no poliposico
<b>CIMP:</b>	núcleos metilados en residuo de citosina/ Producto de metilación de citosina
<b>CpG:</b>	regiones de metilación citosina guanina asociadas a silencimiento de genes
<b>C-T:</b>	citosina-timina
<b>DCC:</b>	cromosoma deletado en el carcinoma colorrectal
<b>E2F:</b>	factor de transcripción gen asociado al control del ciclo celular y diferenciación celular
<b>Epidat:</b>	programa de análisis estadístico de datos
<b>EXO 1:</b>	exonucleasa 1

<b>FAS:</b>	Proteína asociada a apoptosis y su ligando, de la familia del factor de necrosis tumoral
<b>G:</b>	guanina
<b>G0:</b>	fase inicial del ciclo celular
<b>H3:</b>	histona 3
<b>hMSH1 / hMSH2:</b>	proteínas relacionadas con reparación celular
<b>hPMS1 / hPMS2:</b>	proteínas relacionadas con reparación celular
<b>HT29:</b>	línea tumoral derivada de carcinoma de colon
<b>IGF1:</b>	factor del crecimiento insulínico 1
<b>IGF2:</b>	factor del crecimiento insulínico 2
<b>IGFR II:</b>	factor de crecimiento insulínico de tipo II
<b>IL2:</b>	interleucina 2
<b>IL-3R:</b>	receptor de interleucina 3
<b>IMS:</b>	inestabilidad microsatelital
<b>INC</b>	inestabilidad cromosómica
<b>K-ras:</b>	proteína G con actividad de guanidil transferasa hidrolasa
<b>Lef/Tcf:</b>	factores de transcripción de cadherinas
<b>LOH:</b>	perdida de heterocigocidad
<b>MAP:</b>	metaloproteinasa
<b>MGMT:</b>	enzima metil transferasa de guanidina a adenosina
<b>MMR:</b>	mecanismo de reparación de bases en el ADN
<b>MMR:</b>	proteínas relacionadas con la reparación del ácido desoxiribonucleico
<b>NCAM's:</b>	moléculas de adhesión celular renales
<b>P53:</b>	gen supresor relacionado con reparación del ADN
<b>PAF:</b>	poliposis adenomatosa familiar
<b>PCR:</b>	reacción de la polimerasa en cadena
<b>PFH:</b>	poliposis familiar hereditaria
<b>pRb:</b>	proteína del oncogén del retinoblastoma

<b>Raf:</b>	proteína asociada a tirocinasa
<b>Ras:</b>	oncogén relacionado con ciclo celular
<b>RHNM:</b>	Registro Histopatológico de Neoplasias de Mexico
<b>SEER:</b>	Sistema Epidemiológico de Seguimiento de Neoplasias
<b>SMAD 2:</b>	cinasa treonina cinasa de tipo 2
<b>SMAD 4:</b>	cinasa treonina cinasa de tipo 4
<b>SPSS10:</b>	programa estadístico de análisis de dispersión 10
<b>SSA:</b>	Secretaria de Salud y Asistencia
<b>STK15:</b>	gen relacionado con el factor de crecimiento epidérmico
<b>TGF beta:</b>	factor de crecimiento tumoral beta
<b>TNF alfa:</b>	factor de necrosis tumoral alfa
<b>TNF-1R:</b>	receptor 1 del factor de necrosis tumoral
<b>TNM:</b>	estadio patológico para cáncer
<b>UKNEQAS:</b>	sistema de calidad de inmunohistoquímica Reino Unido
<b>VEGF:</b>	factor vascular endotelial de crecimiento
<b>Wnt:</b>	via de señalización APC beta catetina

## INTRODUCCIÓN

El hecho de ser profesor de Anatomía y Anatomía patológica y realizar nuestro trabajo en el laboratorio del Hospital Universitario Dr. José E González de Monterrey (NL México), de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey (México), en la unidad de Oncología gastroenterología y además, observar que el carcinoma de colon ocupa uno de los primeros lugares en la lista de los tumores malignos, nos motivó a realizar la presente tesis doctoral sobre este tema, el cáncer colorrectal (CCR), que ya era motivo de nuestro interés particular y de nuestro trabajo desde hacía tiempo.

El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en países occidentales. La supervivencia global para el CCR es del 50 a 60% y causa la muerte de 20 a 30 pacientes por cada 100.000 habitantes a pesar de los nuevos métodos diagnósticos de imagen y laboratorio.<sup>124</sup> Así, se hace necesario el estudio de sus características clínicopatológicas, de nuevos marcadores pronósticos y de cribado molecular, así como la selección de terapias diana para incrementar su detección temprana e implementar estrategias de prevención y detección, y terapias curativas y de seguimiento en pacientes con riesgo de desarrollar CCR.<sup>215</sup>

El pronóstico del CCR, especialmente en estadios avanzados, no ha mejorado substancialmente aunque sí se entienden mejor sus mecanismos moleculares. En el informe del SEER (*Surveillance Epidemiology and End Results, U. S. National Institutes of Health, USA*, [www.seer.cancer.gov/](http://www.seer.cancer.gov/)) se indica que la supervivencia a 5 años se ha incrementado desde el 56.5% en pacientes diagnosticados a principios de 1980, hasta el 63.2% para aquellos diagnosticados a principios de 1990, y más recientemente, al 64.9% debido al diagnóstico y tratamiento tempranos.<sup>215</sup>

En México, no han disminuido ni la mortalidad, ni la morbilidad por carcinoma colorrectal, que representa el 7.4% de muertes al año y ocupa el duodécimo lugar en la lista de tumores malignos. Es escaso el número de publicaciones de tipo estadístico referidas a carcinoma colorrectal, por lo que los mexicanos se ven obligados a apoyarse en estadísticas y publicaciones de otros países para poder contribuir a la prevención y tratamiento; sin embargo, es bien sabido que existen diferencias genéticas, ambientales y nutricionales entre países y regiones (Tabla 1).

**Tabla 1.** Meta-análisis de diferentes publicaciones en la literatura mundial acerca de las diferencias epidemiológicas del CCR.

Resumen de las evidencias epidemiológicas de los tipos de CCR		
Estudio	Detalles del estudio	Resultados
Wei et al., <sup>269</sup> 2004	Datos de 2 estudios cortos retrospectivos, incluyendo 134365 mujeres	La historia de cáncer colorrectal afecta al riesgo de cáncer de colon más que el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal
Ponz de León et al., <sup>206</sup> 2004	Un registro especializado de carcinoma colorrectal incluyendo 265227 residentes y 2462 casos	Se observó un aumento en la incidencia en todos los segmentos del colon más que un cambio real en la incidencia del colon derecho
Troisi et al., <sup>255</sup> 1999	Del registro de cáncer colorrectal del programa SEER incluyendo 220000 casos	Los rangos de carcinoma de colon proximal fueron más altos que en segmento distal o rectal en este período en USA
Nelson et al., <sup>184</sup> 1997	Un estudio descriptivo poblacional que incluye 38931 casos	Loa afro-americanos desarrollaron con mayor frecuencia carcinoma clónico de segmento proximal con rango de 1.09; mientras que los blancos en el colon distal en rangos de 1.2
Gervaz et al., <sup>77</sup> 2001; Skinner and O'Brien, <sup>235</sup> 1996; Wy et al., 2004	Basado en 23 poblaciones del registro central de cáncer que incluy 336798	Las tasas de CRC ajustadas por edad de incidencia fueron significativamente menor en los asiáticos e isleños del Pacífico (API) que en los blancos y afro-americanos, en particular para el cáncer de colon proximal; entre API, la tasa de cáncer de recto (19,2 por 100000) fue significativamente mayor que las tasas de proximal (15,2 por 100000) y distal (17,7 por 100000)
Gervaz et al., <sup>78</sup> 2004; Iacopetta, <sup>117</sup> 2002; Ji et al., <sup>128</sup> 1998	Un estudio basado en la población del registro de cáncer incluyendo 30693 casos de carcinoma colorrectal	El aumento de las tasas fue mucho más rápido para el cáncer de colon, con tasas de aproximadamente el doble que el cáncer de recto; el cáncer de colon proximal fue más común que el distal en el período de estudio
Irby et al., <sup>119</sup> 2006	Del registro del CCR del registro SEER, incluyendo a 323888 casos	El CCR proximal fue el cáncer más común y el cáncer rectal fue menos común entre la población negra que entre la población blanca
Rothberg et al., <sup>218</sup> 1985; Stang et al., <sup>242</sup> 2007	Del registro nacional de cáncer de la República Alemana, incluyendo 147790 casos	Con el aumento de incidencia de CCR en la RDA, la relación de dos puntos a la incidencia de cáncer de recto se hizo mayor y superó el valor de referencia
Svensson et al., <sup>249</sup> 2002	Un análisis de cohorte edad-período incluyendo 329981 y 32812 casos de hombres y mujeres	La distribución por edad difiere para la localización del tumor y entre el sexo. Los hombre tienen más cáncer distal y de recto, mientras que las mujeres tienen más cáncer de colon proximal
Wu et al., <sup>273,274</sup> 2001	28 poblaciones basadas en el registro central de cáncer incluyendo a 134724 CCR	El rango hombre-mujer aumentó progresivamente desde el colon proximal al colon distal, los rangos de proximal a distal aumentaron gradualmente con la edad
Saltzsein and Behling, <sup>221</sup> 2007	Del registro de cáncer de California incluyendo a 213383 casos	La localización izquierda a derecha aumenta significativamente con el aumento de edad y año de diagnóstico, es mayor en mujeres que en hombres y es mayor en blancos que en otros grupos raciales/étnicos

La mayoría de los CCR se originan de adenomas convencionales, planos o de tipo serrado. Los factores pronósticos del CCR incluyen el estadio de tumor, tipo histológico, y grado de diferenciación.<sup>69</sup> El pronóstico del CCR depende casi exclusivamente del estadio clínico.<sup>206</sup>

La distribución por segmentos de carcinoma colorrectal reportado en la literatura es de un 60% en el colon izquierdo (desde la flexura esplénica hasta la línea dentada), un 35% en el colon derecho, y solo del 2 al 5% de los tumores son sincrónicos. La evidencia acumulada en los últimos veinte años, epidemiológica, clínica, pronóstica y de alteraciones moleculares, demuestra que la localización es un factor importante en el diagnóstico temprano, además de las características clínicopatológicas y el comportamiento biológico.<sup>15,38,60,77,269</sup>

En la mayoría de los casos el diagnóstico de carcinoma colorrectal se realiza cuando se encuentra en etapas avanzadas, sobre todo si se tratan de carcinomas desarrollados en el colon derecho, ya que los síntomas se presentan en forma tardía y la detección por medio de endoscopia es más complicada debido a la localización.<sup>157</sup>

Las publicaciones recientes indican que en las últimas décadas, tanto en la población Americana como en población Hispana, se ha registrado un incremento del 17% para el carcinoma de colon, y un incremento del 75% del carcinoma rectal en pacientes menores de 40 años.<sup>168,240,266</sup> Esto es de gran importancia para el sistema de salud pues los CCR en pacientes jóvenes son neoplasias sumamente agresivas y con pobre supervivencia y, debido a la carga genética y hereditaria, se incrementa el riesgo de desarrollo de segundas neoplasias en colon o en otros órganos.<sup>22,23,184</sup>

Esta evidencia es importante para los habitantes de la región Norte de México, pues esta área está registrada con la mayor incidencia de carcinoma colorrectal de México, según el registro histopatológico de neoplasias en México y publicaciones mexicanas.<sup>168,226</sup> La explicación para este fenómeno diferente a otras regiones del país podría ser la dieta alta en carnes rojas y un estilo de vida similar a las sociedades industrializadas.<sup>150,151</sup>

Existe evidencia de que el CCR se desarrolla a partir de alteraciones genéticas y moleculares específicas, por un lado la vía fenotípicamente supresora con tumores con inestabilidad cromosómica, aneuploidia y pérdida frecuente de heterocigocidad, así como mutaciones que activan oncogenes y bloquean genes supresores. Así, son características del CCR las mutaciones en el APC y p53, BRAF, K-ras.<sup>32</sup> En este grupo de CCR se encuentran el 85% de los carcinomas colónicos esporádicos y los asociados a poliposis familiar hereditaria (PFH).<sup>66,67,78,141</sup>



La vía fenotípicamente mutadora, caracterizada por una inestabilidad de microsatélites, se encuentra presente en el carcinoma colorrectal no asociado a pólipos (CCRNP) y en un 15% de los tumores esporádicos, en el 60% en el gen hMSH2, 30% en el hMSH1, 5% en el hPMS y 5% en el hPMS2. La mayoría de estos tumores son diploides o pseudodiploides con ausencia de mutaciones en los genes habitualmente alterados en la vía supresora (APC, K-ras, p53) y mayoritariamente asociados a fenómenos de metilación y activación por hipermetilación CIMP.<sup>21,179,192,193</sup>

Está documentado en la literatura que la edad, localización y alteraciones moleculares en los CCRs son diferentes; así, los carcinomas esporádicos (alteraciones vía supresora) son más frecuentes en pacientes mayores de 60 años y su localización es izquierda y rectal, mientras que los pacientes jóvenes frecuentemente tienen localización en el lado derecho y asociado a alteraciones en la vía fenotípicamente mutadora (inestabilidad microsatelital hMSH2, hMLH1). Esto está documentado en la literatura mediante la predilección de los tres síndromes por sitios específicos en el colon: el síndrome de poliposis familiar hereditaria (PFH), en el colon distal, y el carcinoma de colon no asociado a pólipos, en el colon proximal. En el primero se origina por alteraciones moleculares asociadas a Inestabilidad cromosómica (INC) y, en el segundo, por alteración en el sistema de reparación de bases del ADN (MMR).<sup>5,78</sup>

Estas diferencias pueden ser explicadas por factores ambientales, la carga genética familiar, diferencias embriológicas y fisiológicas, así como de funcionamiento de los diferentes segmentos del colon.

## Diferencias Anatómicas y Fisiológicas en Cáncer Colorrectal

En países desarrollados la frecuencia de CCR ha disminuido; sin embargo, en países con economías emergentes (México, China, Chile, etc.) su frecuencia se ha incrementado en la última década, una de las probables causas es la adopción de estilos de vida semejantes a los países occidentales y desarrollados; la interacción de factores ambientales y genéticos son elementos importantes en la carcinogénesis rectal. Teniendo en cuenta estos dos eventos, es un factor crítico para el estudio del CCR en países latinoamericanos la identificación de biomarcadores de exposición y genéticos, así como diferencias en las características clinicopatológicas.<sup>180</sup>

Una de las razones para este mayor incremento en la supervivencia en las pasadas dos décadas es la detección temprana del CCR, desafortunadamente sólo el 10% de los casos son diagnosticados en esta situación. Otra razón más importante es la probable heterogeneidad de la enfermedad. En la última década se ha propuesto la existencia de dos distintas categorías de CCR relacionadas con la localización del tumor (proximal o distal en relación con la reflexión

esplénica del colon).<sup>38</sup> El CCR en estas dos localizaciones anatómicas tiene diferentes vías moleculares.<sup>15</sup>

Actualmente, el cáncer de recto se reconoce como una entidad que se maneja dentro del sinónimo de cáncer colorrectal; sin embargo, su comportamiento biológico es más agresivo en comparación con el carcinoma de colon derecho o izquierdo. Por ello, parece lógico dividir estas neoplasias en tres entidades diferentes en comportamiento clínico, biológico y de vías moleculares de presentación.<sup>60</sup>

## **Evidencia Anatómica, Embriológica y Fisiológica del CCR**

El colon derecho e izquierdo anatómicamente se localiza dentro de la cavidad peritoneal, mientras que el recto se localiza dentro de la cavidad pélvica, sus relaciones anatómicas en hombres y mujeres son diferentes y lo hacen fácilmente inaccesible, además de que no presenta barreras anatómicas en su pared, como son la serosa y subserosa que se encuentran en el colon derecho e izquierdo.

Es importante destacar también que el grosor de la pared muscular del colon derecho e izquierdo es diferente a la del recto; en los primeros es más gruesa, mientras que en el segundo es más delgada, asimismo sus complicadas relaciones anatómicas con otros órganos pélvicos le confieren una presentación diferente, con la cual los CCR invaden esta región; todo ello hace que, en el momento de estadiarlos, tiendan a estar en estadios avanzados e involucrando a otros órganos. Por lo tanto, la localización es un factor importante de pronóstico y supervivencia.<sup>42,46</sup>

El colon derecho se origina embriológicamente del intestino medio, mientras que los segmentos del lado derecho hasta la porción superior del canal anal y el recto se originan del intestino posterior. La porción proximal del colon es irrigada por ramas de la arteria mesentérica superior, y, el colon derecho y la porción inferior del recto, por la arteria mesentérica inferior. La innervación del colon derecho proviene del nervio vago, mientras que fibras de S2-S4 inervan el colon distal y el recto.

En cuanto a las funciones fisiológicas, el colon derecho y el recto tienen la función de absorción de agua y poco de nutrientes orgánicos simples, además de formación de heces. Sin embargo, estas funciones son diferentes en cada uno de los segmentos del colon. La absorción de agua y sodio, por ejemplo, es mayor en la porción del ciego y disminuye progresivamente conforme se acerca al recto. La explicación a este fenómeno es la heterogeneidad funcional absorptiva, que se explica en parte por la formación de capilares de múltiples capas que existen en el colon ascendente, mientras que en el colon descendente son de una sola capa.<sup>11,34,235</sup>

Histológicamente, la proporción de células caliciformes productoras de mucina en el sigmoide y el recto es mayor que en el colon derecho, esta diferencia es debida a que en el sigmoide y el recto la superficie mucosa necesita una mayor protección contra los estímulos físicos y químicos.<sup>10</sup>

El recto tiene en su epitelio de revestimiento una gran cantidad de células endocrinas comparado con otros segmentos. El índice de apoptosis es menor en el colon derecho y mayor en el colon izquierdo y recto, lo cual sugiere una posible relación con una mayor incidencia de cáncer.<sup>227</sup>

Los ácidos grasos de cadena corta y el etanol son sustancias que se encuentran en mayor concentración en el colon proximal; sin embargo, en el colon distal y el recto, los derivados de proteínas forman la mayor parte de los productos de fermentación. En el colon derecho, los mucopolisacáridos neutros son componentes predominantes del contenido luminal, mientras que en el recto predominan las mucinas. Se concluye que en las diferentes partes del intestino grueso existen niveles de fermentación y sus productos, los cuales afectan probablemente muchas funciones del epitelio colónico relacionadas con su metabolismo, capacidad absorbente y su capacidad de motilidad.

Esta evidencia favorece la teoría de que en cada uno de los espacios lumbinales del colon existen diferentes microambientes que forman complejos químicos, y éstos podrían ser la etiología del daño de la estructura genómica del ADN, ya sea mediante mecanismos directos (alteración epigenética) o favoreciendo la activación de genes previamente dañados (alteración genética familiar o adquirida).

Investigaciones extensas han demostrado la asociación de la exposición a componentes del óxido nítrico, hidrocarburos policíclicos aromáticos y aminas heterocíclicas aromáticas, todas ellas estudiadas como biomarcadores de riesgo de enfermedad o de factor de riesgo de cáncer en humanos, debido a que muchos de estos se encuentran como productos de desdoblamiento metabólico por bacterias o en productos o conservantes químicos en alimentos y, evidentemente, su concentración es diferente en cada uno de los segmentos del colon.<sup>25,102,103,113</sup> (Tabla 2).

En un estudio de Stigliano *et al.*<sup>245</sup> (2008), la localización del CCR en el lado derecho (ciego y colon transversal) es significativamente más frecuente en pacientes con carcinoma colorrectal no asociado a pólipos (CCRNP) que en el CCR esporádico. La evidencia actual demuestra que el CCR puede dividirse en entidades diferentes según sus alteraciones moleculares, presentación clínica, hallazgos anatomopatológicos y comportamiento biológico (Tabla 2).

**Tabla 2.** Diferencias anatómicas, fisiopatológicas y moleculares en el cáncer de colon.

Diferencias en los tres subgrupos de Carcinoma colorectal			
Hallazgo	Colon proximal	Colon distal	Recto
<u>Fisiología</u>			
Origen embriológico	Intestino medio	Intestino grueso	Intestino grueso
Riego arterial	Amas de la arteria mesentérica superior	Ramas de la arteria Mesentérica inferior	Ramas de la arteria Mesentérica inferior
Inervación	Nervio vago	S2, S3, S4	S2, S3, S4
Histología	Mucosa densa con vesículas apicales	Intestino grueso con células caliciformes	Rico en células neuroendocrinas
Función principal	Absorción de agua y nutrientes	Absorción de agua y nutrientes	Formación de heces
Otros hallazgos	Fermentación de etanol y cadenas cortas de ácidos grasos.	Fermentación de proteínas: Predominantemente mucopolisacaridos neutros	Predominantemente mucinas acidas
<u>Carcinogénesis</u>			
Mecanismo molecular	IMS	INC	Estabilidad microsatelite, Inestabilidad cromosomal, contribución de TP53, APC/vía $\beta$ -catenina; sobre-expresión de COX2, menor cantidad de mutaciones de Kras.
Enfermedad Hereditaria Predominante	HNPCC	FAP	
<u>Factores de riesgo</u>			
Fibra en la dieta	Gran factor protector	Efecto protector	Poco o nulo factor protector
Suministro de carne	Carne asada	Carne procesada	Carne roja
Calcio y Vitamina D	Efecto protector menor	Efecto protector	Ningún efecto protector
Actividad física	Efecto protector	Efecto protector	Ningun efecto protector

COX2: Ciclooxygenasa -2; HNPCC: cancer colorectal no poliposico; FAP :Poliposis adenomatosa familiar; IMS: Inestabilidad Microsatelite; INC: Inestabilidad cromosomal

La toma de decisiones terapéuticas quirúrgicas, oncológicas, pronósticos y de selección de tratamiento y predictivas en el carcinoma de colon debe ser individualizada para cada paciente con CCR, pues las alteraciones preneoplásicas y factores predisponentes pudieran no ser los mismos y podrían alterar el curso clínico, la respuesta a tratamiento y el pronóstico.<sup>75,76,88</sup>

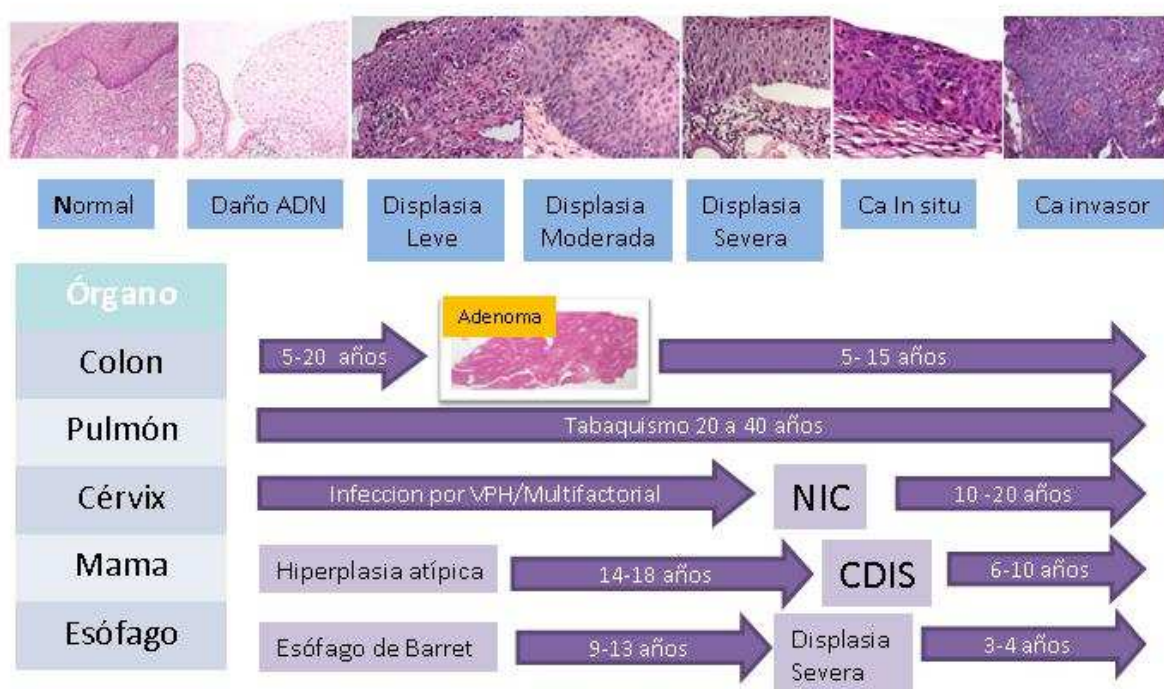
## Características de las células neoplásicas

El cáncer es una enfermedad genética, el descubrimiento de la estructura de ADN por Watson y Crick en el siglo pasado, y los avances en los últimos 25 años en la tecnología e investigación del cáncer en modelos animales y en la clínica en humanos, así como la información obtenida de éstos estudios, nos ha permitido entender la diversidad de factores y elementos que participan en los cambios dinámicos del genoma en la génesis del cáncer.

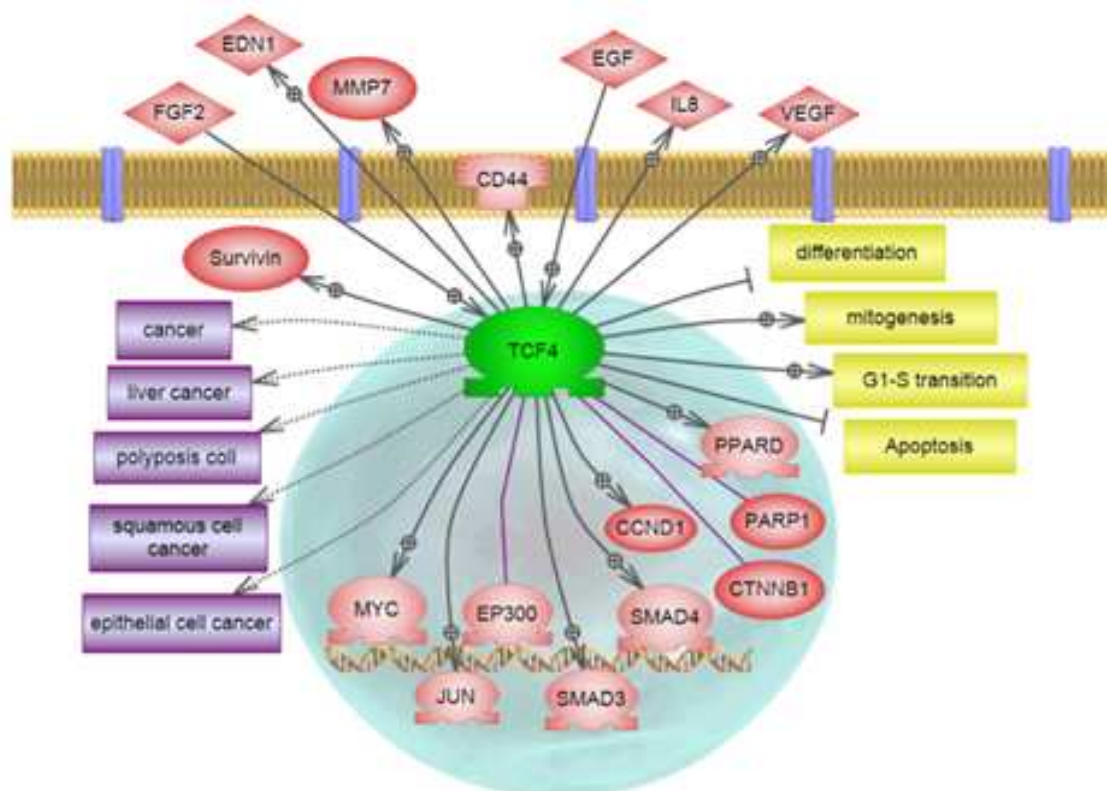
Los principales fundamentos describen el descubrimiento de mutaciones que producen oncogenes con función dominante en las células cancerígenas y genes supresores tumorales con pérdida recesiva de su función; ambos factores se han descrito en modelos experimentales en animales y en cultivos de células de pacientes con cáncer.<sup>270</sup>

La investigación de la carcinogénesis *in vitro* e *in vivo*, así como el proyecto genoma humano nos han ayudado a entender la complejidad de la enfermedad en el laboratorio y la clínica, y en la última década nos han revelado un pequeño número de alteraciones bioquímicas y moleculares, al igual que el comportamiento celular y los principios básicos de la génesis y transformación que comparten casi la gran mayoría de los cánceres.

La evidencia publicada en la literatura establece que la carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos que progresa desde la iniciación de una célula anormal con alteraciones en la estructura molecular de su ADN, con la consiguiente transformación hacia un clon de células altamente agresivas malignas; sin embargo, este proceso no es inmediato, se necesitan daños y alteraciones de múltiples factores en el genoma de las células para que éstas desarrollen un clon de células genéticamente comprometidas a desarrollar una lesión maligna. Un grupo importante de lesiones malignas se relacionan con la edad y su presentación clínica.<sup>213</sup> (Figs. 1 y 2).



**Figura 1.** Evolución cronológica de la carcinogénesis en humanos.



**Figura 2.** Alteraciones moleculares en cánceres humanos (Nature Reviews in Cancer, 2002).

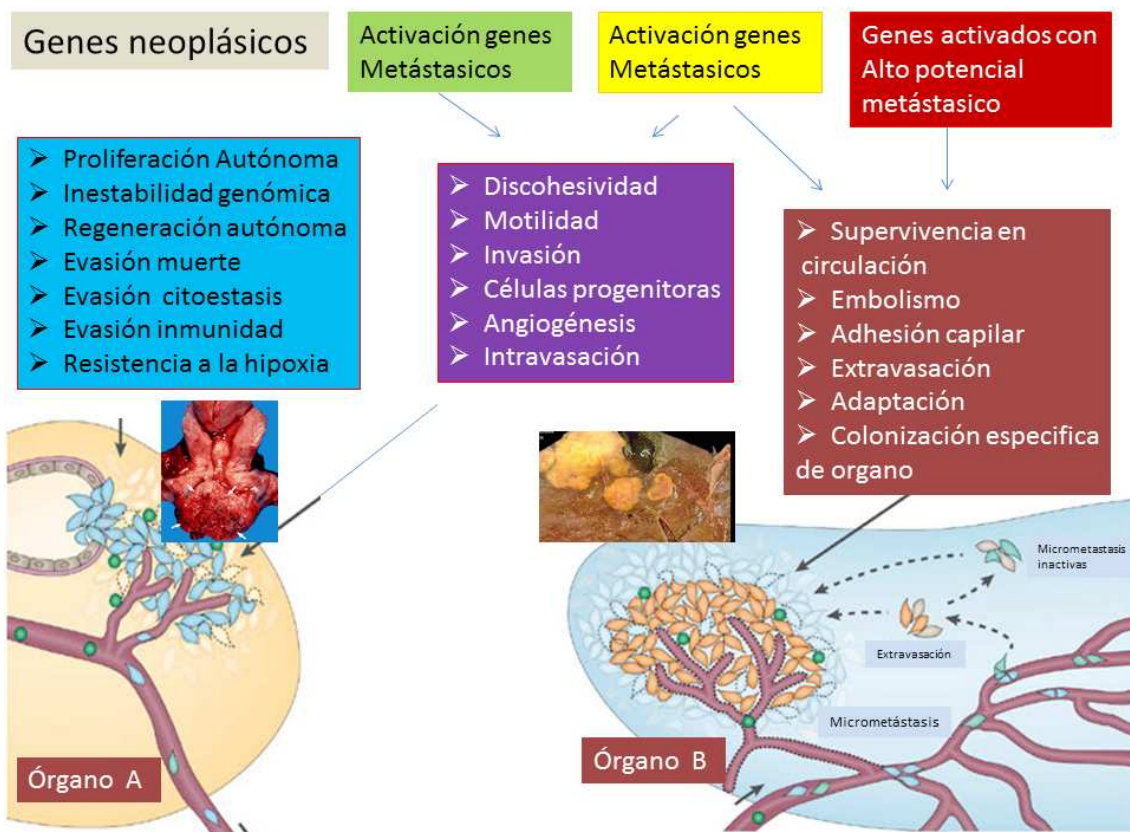
El análisis morfológico de las lesiones neoplásicas en la mayoría de los órganos revela que estas lesiones presentan procesos que se inician con alteraciones preneoplásicas (displasias) hasta lesiones invasoras con capacidad infiltrante y metastásica.<sup>73</sup> Estas observaciones demuestran que las células presentan una alteración genómica progresiva, con presencia de inestabilidad genética, mutaciones, y pérdida y ganancia de funciones en su estructura génica.<sup>141</sup>

La evidencia en investigación *in vitro* con células malignas demuestra que la transformación es un proceso en varios pasos: una célula normal al menos necesita dos cambios genéticos importantes para su transformación maligna y formar tumores.<sup>89</sup> Esto es evidente en células en cultivo, sin embargo, en células humanas parece ser que se requieren un sin número de factores para conferirles el potencial neoplásico.<sup>18,19</sup> Ambos conocimientos descartan la teoría de que los eventos que dañan o activan los genes provocando una neoplasia son progresivos e irreversibles.<sup>188</sup>

Los seis mecanismos relacionados con el crecimiento tumoral son los siguientes (Fig. 3):

1.- Autosuficiencia en señales de crecimiento

- 2.- Insensibilidad a los factores que regulan el crecimiento celular
- 3.- Escape de la muerte celular programada (apoptosis)
- 4.- Inmortalidad celular
- 5.- Angiogénesis
- 6.- Invasión tisular y metástasis



**Figura 3.** Características de las células neoplásicas.

De forma paradójica, los mecanismos anteriormente enumerados son los que protegen a las células de su transformación neoplásica, siendo el daño en su estructura genómica el que al final provoca una neoplasia. Esto explica que el cáncer sea en realidad un evento raro en los seres humanos. A continuación describiremos en forma breve cada uno de estos mecanismos, con el fin de establecer el marco teórico de los eventos en el CCR.



## 1.- Autosuficiencia en señales de crecimiento

Las células normales requieren factores de crecimiento antes de activarse de su estado de reposo al estado proliferativo activo (Ej.: daño tisular). Esto se logra mediante vías de señalización celular: factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular e interacciones entre las células y sus componentes intracelulares y extracelulares. En este sentido la mayoría de los oncogenes funcionan estimulando estos mecanismos.

Las células neoplásicas producen sus propios factores de crecimiento, esto provoca una disminución en la dependencia y el estímulo de los factores microambientales que regulan el crecimiento celular y tisular, que controlan en forma normal a las células en los órganos y tejidos, cuando sufren un daño estructural en su micro o macroambiente.

Los mecanismos moleculares descritos mediante los cuales las células adquieren autonomía son: la alteración de las señales de crecimiento extracelular de los transductores celulares de estas señales, o de los circuitos intracelulares que traducen estas señales y las activan. En este contexto las células neoplásicas producen sus propios factores de crecimiento creando estímulos de crecimiento (estimulación autocrina). Los receptores de membrana que traducen señales de crecimiento también se encuentran alterados en su regulación y función y son factores que explican la patogénesis tumoral.

Las células neoplásicas también cambian los tipos de receptores de la matriz extracelular (integrinas) favoreciendo la producción de señales que intervienen en el crecimiento celular. Los receptores de integrinas estimulan señales dentro del citoplasma celular que van desde alteraciones en la motilidad celular, la resistencia a la apoptosis y, activación del ciclo celular. Además, los factores de crecimiento y las integrinas, al trabajar sinérgicamente, activan la vía de SOS-Ras-Raf-MAP quinasas, las cuales favorecen la activación del ciclo celular y la resistencia a la apoptosis, estimulando el crecimiento neoplásico y la formación de tumores (Fig. 4).

El mejor ejemplo de esta vía carcinogénica lo demuestra el cáncer de colon, más de la mitad de estos tumores tienen alteraciones mutacionales en oncogenes Ras; el porcentaje restante presenta defectos en las vías de señalización de crecimiento que simulan vías de alteración del oncogén ras. La naturaleza de esta última hipótesis permanece aún en estudio.<sup>14</sup>





La vía del gen del retinoblastoma (pRb) regula en este sentido el ciclo celular, una disrupción en la vía pRb que libere el factor E2F permite a la célula permanecer en estado proliferativo activo, permitiéndole ser insensible a los factores inhibitorios de crecimiento.

La vía de pRb es regulada por el TGF beta y otros factores extrínsecos, y puede estar alterada en una gran variedad de formas en diferentes tipos de tumores. Algunos no responden a la represión reguladora de TGF beta, mientras que otros muestran receptores mutantes disfuncionales.<sup>270</sup>

La proliferación celular no sólo depende de la falta de respuesta a los factores anti-crecimiento o el estado postmitótico irreversible, también previene la multiplicación celular y la diferenciación. Las células tumorales poseen varias estrategias para evitar la diferenciación celular. Ejemplos de esto son la vía Mad-Max que es un grupo de factores de transducción asociados al oncogén c-myc, los cuales son resistentes a las señales de diferenciación celular.<sup>173</sup> En el caso de la carcinogénesis de colon, la inactivación de la vía APC/ $\beta$ -catetina provoca la falta de diferenciación terminal de los enterocitos en las criptas colónicas, activándolos en un estado postmitótico de diferenciación interrumpida.<sup>32,238</sup>

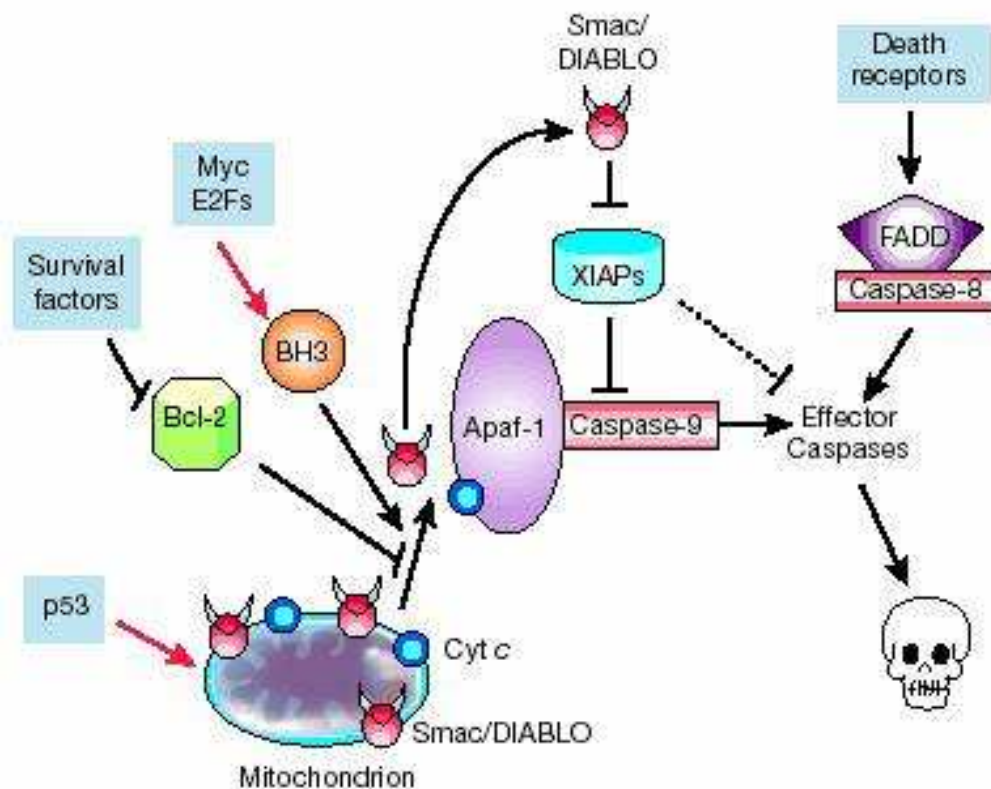
### **3.- Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)**

La habilidad de las células tumorales para incrementar su tamaño en gran parte es causada por su capacidad para evadir los mecanismos de muerte celular programada (apoptosis). Los componentes del mecanismo apoptótico se dividen en sensores y efectores, los primeros se encargan de monitorizar el medio ambiente intracelular buscando condiciones que normalmente activan o inhiben la apoptosis. Estas señales regulan el segundo mecanismo que activa a los efectores de la apoptosis, provocando que la célula viva o se active la muerte celular programada.

Ejemplos de sensores de la apoptosis incluyen a los factores IGF1/IGF2 a través de sus receptores IGF-1R y IL3 y su receptor, IL-3R.<sup>40,163</sup> Las señales de muerte celular mediante los receptores de FAS y su ligando FAS y mediante el TNF alfa, el cual se une al TNF-R1.<sup>12</sup> Estas señales se activan cuando se detectan anomalías como daño en el ADN, desregulación de señalización provocados por oncogén, factores insuficientes para la supervivencia e hipoxia.<sup>61</sup>

La mayoría de las señales que favorecen la apoptosis convergen en las mitocondrias, las cuales responden a señales proapoptóticas liberadas por el citocromo C, un potente catalizador de la apoptosis,<sup>79,84</sup> activando la familia de proteínas Bcl 2 proapoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bim) o antiapoptóticas (Bcl-XL, BclW).

La proteína supresora tumoral p53 permite la activación de la apoptosis estimulando la expresión de BAX en respuesta a la detección de daño en el DNA; asimismo, Bax estimula la liberación de citocromo C por las mitocondrias. La activación de esta maquinaria favorece la liberación de caspasas 8 y 9, proteínas que ejecutan la muerte celular programada digiriendo los orgánulos y la estructura intracelular. La ausencia de estos mecanismos de regulación (Ej.: linfoma folicular) permite a las células producir tumores al immortalizar y favorecer en las células la resistencia a la muerte celular programada (Fig. 5).<sup>29</sup>



**Figura 5.** Diagrama de la vía de la muerte celular por Apoptosis.

#### 4.- Características adquiridas por las células neoplásicas

Los mecanismos de autonomía de crecimiento, resistencia a los mecanismos de regulación del crecimiento celular y la resistencia a la apoptosis parecerían ser suficientes para que los tumores crecieran en tamaño y se expandieran; sin embargo, parece ser que no es así, cada célula contiene un reloj que le obliga a tener un tiempo de actividad y luego muere, aún las neoplásicas. En los trabajos de Hayflick y de Hayflick *et al.*<sup>97-101</sup> se demostró que las células

después de un tiempo de doblar su población, dejan de crecer y mueren, a este proceso se le denomina envejecimiento.

El envejecimiento se puede detener temporalmente en fibroblastos en cultivos celulares al inhabilitar los genes pRb y p53, los cuales les permiten a estas células seguir creciendo; sin embargo, en un tiempo entran en un segundo estado de crisis caracterizado por muerte masiva, inestabilidad nuclear con fusiones cromosómicas y, ocasionalmente, la generación de una nueva célula (1 en 10,000000) que tiene la capacidad de replicarse sin límite, un fenómeno denominado inmortalización.<sup>272</sup> Estos experimentos demostraron que las células neoplásicas necesitan pasar por este fenómeno de progresión tumoral para adquirir su potencial de crecimiento e inmortalización.

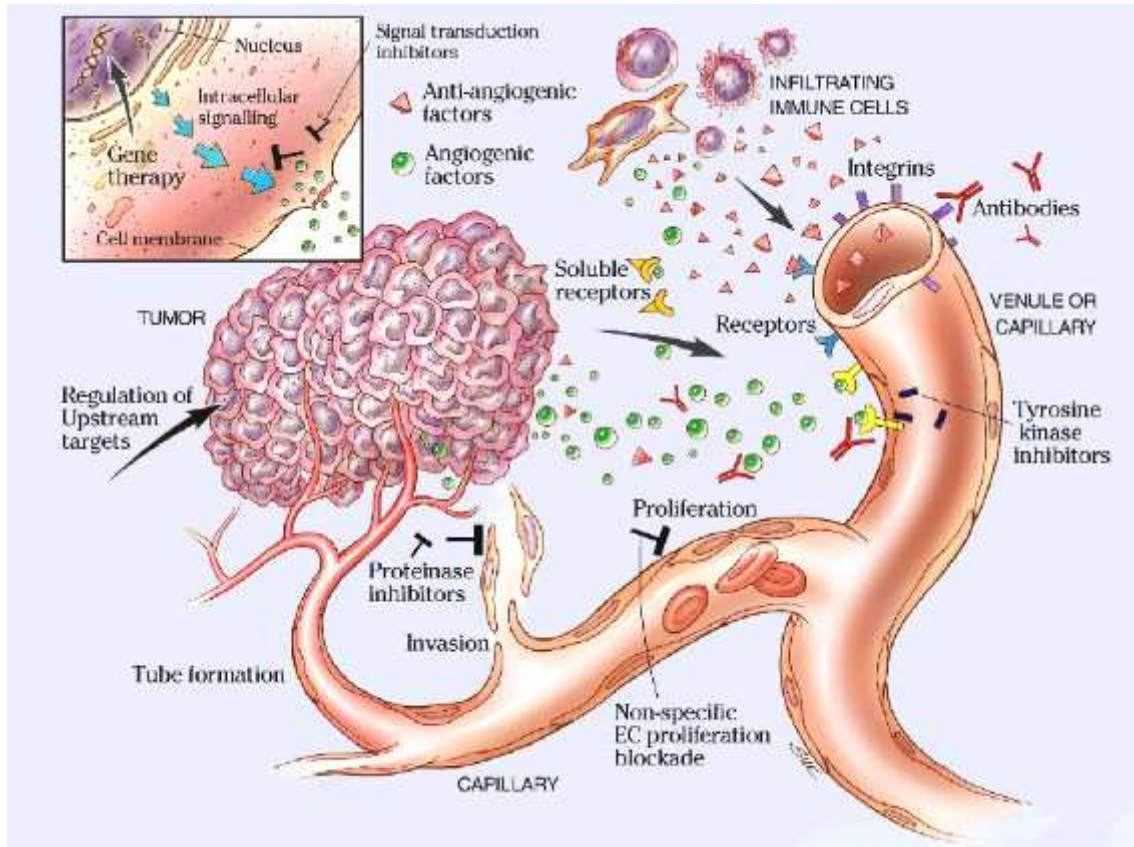
Los telómeros son la herramienta relacionada con el límite de generaciones que normalmente se replican en una célula. Los telómeros son las porciones terminales de los cromosomas que se encargan de regular la replicación celular así como señalar el envejecimiento celular, el acortamiento de los extremos de los cromosomas (telómeros) favorece el desarreglo de los cromosomas dentro del núcleo, llevando irremediablemente a la muerte celular.<sup>49,50</sup>

En un grupo de células neoplásicas esta situación no sucede, los telómeros son mantenidos en tamaño y forma, favoreciendo la inmortalidad celular y asegurando la capacidad replicativa y de crecimiento,<sup>229</sup> del 85 al 95% de este fenómeno sucede a través de la activación de la enzima telomerasa, la cual añade hexanucleótidos extra dentro de los extremos de las porciones terminales del ADN<sup>36</sup> y, en el restante 15% mediante ALT (recombinación intercromosomal de secuencias).<sup>37</sup> Estos mecanismos permiten a las células transformadas seguir la multiplicación ilimitada de las células neoplásicas.

## 5.- Angiogénesis sostenida

El oxígeno y los nutrientes suministrados por los vasos sanguíneos son imprescindibles para las funciones y supervivencia de las células y tejidos, los cuales deben estar en los 100 micrómetros adyacentes a las redes capilares. Este hecho es igual de importante para las células neoplásicas, la señalización inicial y activación de la angiogénesis se inicia con el VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico, los cuales se integran a los receptores de tirosinquinasa transmembranosos que se encuentran en las células endoteliales. Existen evidencias experimentales en modelos *in vitro* e *in vivo* y en la clínica de que la angiogénesis es un factor vital para la supervivencia neoplásica, además de que la neovascularización es un prerrequisito para una progresión clonal rápida, asociada con la formación macroscópica de tumores. Los tumores aparentemente activan los mecanismos

angiogénicos cambiando los mecanismos inhibidores (Ej.: tromboposdina 1) en señales iniciadoras de formación de nuevos vasos sanguíneos (Fig. 6).<sup>70,71</sup>



**Figura 6.** Mecanismos de angiogénesis e invasión.

## 6.- Invasión tisular y metástasis

En el proceso de progresión tumoral, tarde o temprano aparecen clones con capacidad invasiva que infiltran los tejidos vecinos y posteriormente viajan a través de la circulación para producir nuevos tumores (metástasis). Este fenómeno es la causa del 90% de las muertes en cánceres humanos.<sup>239</sup> Este último mecanismo adquirido de las células neoplásicas requiere que éstas, en un proceso de múltiples cambios, adquieran las características anteriormente descritas.

El proceso de invasión es complejo y actualmente apenas se empiezan a describir las interacciones entre el estroma, las células neoplásicas y el microambiente neoplásico y de las células normales. Entre algunas de las moléculas que participan en la transformación de células con capacidad invasiva se encuentran las proteínas relacionadas con la adhesión celular (CAM's) y la familia de las cadherinas dependientes de calcio, ambas forman parte

importante en los mecanismos de adhesión célula a célula y, por último, las integrinas que forman parte de las interacciones de adhesión con la matriz extracelular.<sup>9</sup>

La alteración más frecuente en el microambiente de interacción células-matriz extracelular en neoplasias involucra a la familia de las cadherinas. La unión entre células adyacentes por las cadherinas resulta en la transmisión de señales anti-crecimiento mediante contacto citoplásmico con el complejo  $\beta$ -catenina con los circuitos citoplásmicos de señalización intracelular que incluyen los factores de transcripción Lef/Tcf.<sup>44</sup> La función de la cadherina se pierde en la mayoría de las células neoplásicas mediante mecanismos que incluyen la inactivación mediante mutación de los genes de E-cadherina o  $\beta$ -catenina, represión transcripcional o proteólisis del dominio extracelular de la cadherina; la interferencia de la función de la E-cadherina en modelos experimentales favorece la capacidad invasiva y metastásica en neoplasias.

Los cambios en la expresión de NCAM's, los cuales cambian su estructura conformacional de expresión, favorecen la aparición de clones con poca adhesión celular en tumores de Wilms,<sup>131</sup> carcinoma de células pequeñas de pulmón<sup>133</sup> y en una disminución en la expresión en cánceres invasivos de páncreas y colorrectales.<sup>68</sup> Experimentos en ratones transgénicos favorecen la teoría del papel funcional de la adhesión normal célula a célula de las N-CAM en la supresión de clones metastásicos.

Los cambios en la función de las integrinas y su relación con la matriz extracelular al regular la integración de la matriz destruida por proteasas, favorece la invasión por células neoplásicas.<sup>262</sup> La expresión de subunidades de integrinas en células en cultivo inducen o inhiben el potencial invasivo o el comportamiento metastásico.<sup>18,244</sup>

La activación de las proteasas extracelulares y las especificaciones de adherencia de las cadherinas, NCAM's e integrinas desempeñan un papel fundamental en la adquisición de potencial invasivo y capacidad metastásica.

## Carcinogénesis

El cáncer es la enfermedad genética más frecuente de los seres humanos sin daño estructural al ADN. Cáncer es un término genérico para denominar a un grupo de enfermedades que tienen en común la habilidad de crecer en forma no controlada y con pérdida de respuesta a los mecanismos reguladores de crecimiento, provocando la aparición de tumores, además de adquirir propiedades de inmortalidad e invasión a otros órganos. Los cambios genéticos en las células contribuyen al desarrollo multisequencial de tumores, provocando mutaciones de diferentes tipos de genes (protooncogenes), genes supresores



tumorales, genes relacionados con la regulación del ciclo celular y genes cuya función es mantener la estabilidad genómica celular.<sup>137,236</sup>

La etiología de la formación de neoplasias en seres humanos es multifactorial en donde el medio ambiente, el estilo de vida, la herencia y la edad interpretan un papel en cualquiera de las neoplasias. Además, es bien conocido que el proceso de formación de neoplasias es un proceso de múltiples pasos: La iniciación, la promoción y, por último, la progresión (Fig. 3).

El proceso de iniciación es un requisito esencialmente irreversible para la formación de neoplasias, éste es el primer paso en la carcinogénesis, en donde la célula dañada muestra mutaciones en su ADN,<sup>51</sup> el cual predispone a las células dañadas y a sus descendientes al desarrollo de neoplasias. Las secuencias de ADN responsables de la transformación neoplásica se denominan oncogenes.

Estas alteraciones mutacionales favorecen la desregulación de los genes relacionados con las vías de señalización que controlan la proliferación celular y/o la inhibición del proceso natural de comunicación, de desarrollo y diferenciación celular. Es evidente que este mecanismo solo, no es suficiente para favorecer la aparición de neoplasias, se requiere un mayor número de alteraciones para que esto suceda, pero la mutación inicial favorece un potencial estable para su desarrollo. La activación de los oncogenes es producida por cinco mecanismos.<sup>209</sup>

1. Sobreexpresión del oncogén
2. Amplificación del protooncogén
3. Incremento en los niveles de transcripción del oncogén con un consecuente incremento en los productos del gen
4. Translocaciones cromosómicas que provocan desregulación del gen
5. Alteraciones en la estructura de la proteína oncogénica.

Los genes supresores tumorales son reguladores del crecimiento celular, inhibiendo la replicación celular. Ejemplo de estos son el Retinoblastoma y la proteína del Tumor de Wilms.<sup>143</sup> En las células normales los genes supresores tumorales funcionan regulando las distintas etapas del ciclo celular. La mutación de estos genes provoca la pérdida de su función, favoreciendo la progresión tumoral.<sup>204</sup>

La carcinogénesis es un fenómeno ampliamente estudiado y del cual aún desconocemos en gran parte su biología y causas, sin embargo, las teorías más aceptadas para su origen son:

1. Mutación de genes.<sup>27</sup>

2. Teoría de la Aneuploidia.<sup>59</sup>
3. Teoría Epigenética.<sup>13</sup>

En conjunto, una o dos de las anteriores alteraciones favorecen la aparición de tumores, además de esto parece ser que un equilibrio macrogenómico entre genes supresores y oncogenes favorece o bloquea la aparición de una neoplasia.

## Mecanismos Epigenéticos en Carcinogénesis

Las alteraciones epigenéticas incluyen cambios heredables en la expresión de genes que no son causados por una alteración directa de la secuencia de nucleótidos del gen. La metilación anormal del ADN en los sitios de transcripción del ADN conlleva el silenciamiento (inactivación) de los genes que protegen contra la formación de tumores o de la reparación del ADN.<sup>107</sup>

Específicamente, la región promotora anormal de metilación de un gen supresor tumoral contribuye estrechamente con el silenciamiento hereditario y de esta manera causa la pérdida de la función del gen, fomentando la carcinogénesis. Normalmente, las células muestran ausencia de metilación en los lugares CpG localizados en los sitios de transcripción, donde inicia el ADN y el ARN. Este evento favorece el reclutamiento de este gen para ser activado e iniciar el proceso de transcripción de la información genética que contiene.

En las células neoplásicas estas regiones CpG se encuentran metiladas provocando el silenciamiento del gen y por ende la ausencia de transcripción y función de sus productos y pueden coadyuvar con otros eventos relacionados con el silenciamiento en la cromatina que previenen la transcripción normal del ADN. La pérdida de la función de los genes supresores en la carcinogénesis se encuentra asociada a mutaciones, a veces en regiones codificadoras del gen, con la consecuente producción incompleta de la proteína; sin embargo, este fenómeno también ocurre cuando la región CpG se encuentra hipermetilada provocando el silenciamiento del gen.<sup>132</sup>

Los genes estudiados relacionados con la presencia de este fenómeno se encuentran entre los que favorecen funciones de replicación, migración celular, reconocimiento de sustratos metabólicos, diferenciación, crecimiento y apoptosis. Los carcinomas son los candidatos más frecuentemente asociados con este mecanismo de silenciamiento epigenético por metilación de genes, ejemplo de éstos son el cáncer de mama, colon y pulmón.

Los genes con inactivación (silenciados/apagados) por metilación que se encuentran relacionados con actividad antitumoral, contribuyen a la aparición de sucesos celulares anormales, que contribuyen a la progresión tumoral. En este sentido el mecanismo de genes



silenciados es el segundo suceso después de la mutación genómica, mediante el cual los genes supresores tumorales contribuyen en la carcinogénesis.<sup>132</sup>

En el modelo clásico de Knudson (2000),<sup>144</sup> la pérdida de la función de un gen supresor tumoral no afectaría la función de la célula, a menos que ambos alelos del gen fueran inactivados. En el caso de la metilación de los segmentos de CpG en el genoma operan de la misma forma, en donde un alelo del gen es metilado y el segundo se encuentra perdido. Aunque la pérdida de los dos alelos por mutación es poco común, y es más frecuente encontrar inactivados ambos alelos del gen por ADN metilado.

El modelo de Knudson,<sup>144</sup> también describe la inactivación de genes supresores tumorales en cáncer hereditario, en donde un alelo se encuentra mutado en la línea germinal, y la pérdida del segundo ocurre en tumores a través de la delección cromosómica. Es posible también explicar este fenómeno a través de la metilación de la región CpG provocando el segundo golpe en un gen mutado desde la línea germinal, en este caso la metilación ocurre únicamente en el gen no mutado.

En la literatura se encuentran identificados una cantidad de genes relacionados con su estado de metilación e inactivación de las regiones CpG (Tabla 3). La evidencia reportada sugiere que este mecanismo es más frecuente que las mutaciones.

La mayoría de los fenómenos de inactivación de genes ocurren con frecuencia en lesiones precursoras de neoplasias, y el proceso de inactivación epigenética ocurre durante toda la progresión de la lesión neoplásica. Algún ejemplo de estos mecanismos de inactivación por metilación incluye la pérdida de función del gen relacionado con la reparación del ADN P-metilguanidin ADN metiltransferasa (MGMT), el cual previene la transición de Guanidina a Adenosina (G-A), que frecuentemente se encuentra en estadios tempranos en el CCR, la cual provoca la acumulación de defectos en genes reguladores como K-RAS y p53. En el 10 a 15% de los pacientes con CCR se observa inestabilidad microsatelital, aproximadamente del 70 al 80% tienen inactivación de genes por metilación del gen MLH1.

Además, la citosina metilada es directamente mutagénica, provocando trasposiciones de C-T. En algunos tipos de cánceres como el CCR, la inactivación epigenética es un paso crítico para el inicio y mantenimiento temprano de la tumorogénesis.<sup>135</sup>

En el CCR se ha demostrado que la vía de señalización Wnt es una alteración indispensable para la progresión. La activación de los receptores Wnt inhibe la fosforilación de la beta catenina. La estabilización y acumulación de beta catenina estimula la transcripción de genes de la cascada de Wnt.<sup>250</sup>

La vía de señalización de Wnt en el cáncer de colon desempeña un papel importante ya que esta vía de señalización se encuentra desregulada como resultado de las mutaciones que afectan a la falta de producción de proteínas, desde los receptores de superficie ligandos de la vía Wnt. En este sentido, la alteración epigenética de las proteínas SFRP (inactivación de genes por metilación), las cuales son ligandos de Wnt en la superficie de la membrana celular, provoca la inhibición de la señalización de la vía Wnt, con la consecuente acumulación de la  $\beta$ -catenina. Estos eventos se encuentran en las formas iniciales de la formación de adenomas en el cáncer de colon.<sup>24,248</sup>

**Tabla 3.** Genes relacionados con inactivación por metilación (alteración epigenética) en el CCR.

Metilados	No metilados
Rb	NF1,NF2
P16	MSH2
VHL	PTEN
MLH1	P53
E cadherina	PTC
BRCA 1	BRCA 2
APC	ATM

## Mecanismos Moleculares de Inactivación Epigenética

Los mecanismos mediante los cuales los genes son inactivados dependen de una compleja serie de modificaciones enzimáticas de las histonas (proteínas que en conjunto con el ADN forman la cromatina, ver Figura 7). La metilación del ADN y una serie de modificaciones en los residuos de aminoácidos de las histonas resultan en la modificación de la estructura de la cromatina, que se transforma y forma una configuración en que la transcripción del ADN es reprimida. Estos cambios en la estructura del ADN provocan más fenómenos de metilación adicionales durante los eventos de progresión en el cáncer.

Las ADN-dimetil transferasas (ADNDT) favorecen el proceso de hipermetilación en los genes promotores. Las ADNDT actúan también como plataformas para otras proteínas que

mantienen la configuración de las histonas en la configuración que suprime la capacidad transcripcional de la cromatina.

La metilación y acetilación de residuos específicos de histonas proveen a las histonas de un código de señales en el que favorecen un estado activo de transcripción en los genes. Uno de los códigos de marca más importante en el estado transcripcional de los genes es la acetilación de la histona H3 lisina 9; su acetilación previene la subsecuente metilación de los residuos de lisina, los cuales son un residuo de inactivación transcripcional.<sup>280</sup>

Los cambios en la acetilación y metilación de los residuos de histonas son influenciados por la metilación del ADN; por ejemplo, existe un ensayo de precipitación de cromatina del gen MLH1 en cultivos de células de cáncer de colon, en el cual, el gen MLH1 se encuentra metilado e inactivado, en comparación con la línea celular donde el gen MLH 1 no se encuentra metilado y se transcribe normalmente, debido a que el residuo H3 lisina 9 se encuentra acetilado y no metilado favoreciendo el estado transcripcional.<sup>62</sup>

La metilación de las regiones promotoras CpG y la desacetilación que ocurren durante la carcinogénesis, conducen a cambios conformacionales que físicamente obstruyen el acoplamiento de enzimas que tratan de activar la región promotora.

En la Figura 7 se esquematizan los diferentes procesos en donde la metilación cumple un papel importante en el funcionamiento celular.



**Figura 7.** Efectos de la metilación del ADN en la fisiología celular.

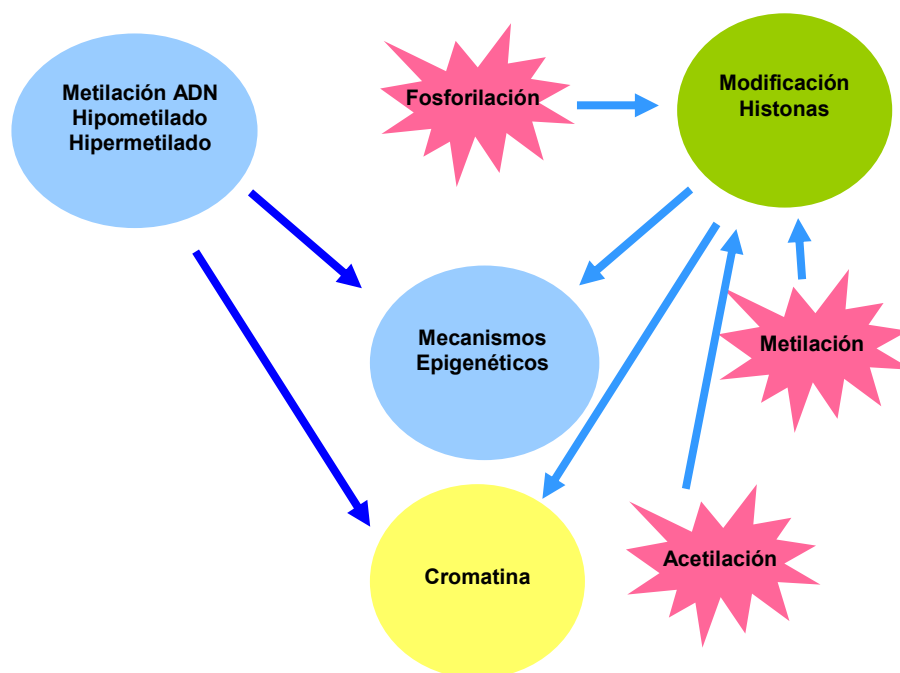
El CCR es un ejemplo de la versatilidad y plasticidad de las interacciones que favorecen su aparición. En la siguiente sección se detallarán los mecanismos preponderantes en la aparición del CCR.

## Mecanismos Epigenéticos en el CCR

Las alteraciones epigenéticas que activan o silencian genes relacionados con la carcinogénesis es otro de los mecanismos mediante los cuales los núcleos CpG se hipermetilan, produciendo fenotipos metilados de estos núcleos (CIMP).<sup>254</sup> El ADN hipermetilado actúa solo o en combinación con alteraciones genéticas inhibiendo la función de genes supresores tumorales. Un ejemplo es la metilación del sitio promotor del gen asociado a la reparación MLH1, encontrado en la mayoría de los CCR con inestabilidad de microsatélites, provocando su represión postrascriptcional.<sup>48,108</sup>

La metilación aberrante del ADN puede también activar genes. La expresión de ambos alelos del gen IGF2 incrementa el crecimiento celular y tumoral; así mismo, la pérdida de expresión del IGF2 se ha descrito como un factor de riesgo para cáncer colorrectal.<sup>53</sup>

La acetilación, deacetilación y metilación de histonas son otros mecanismos por los cuales se pueden alterar epigenéticamente los genes, un ejemplo es que en células de mamíferos se ha demostrado que la deacetilación de histonas por hipoxia reduce considerablemente la expresión de MLH1 (Fig. 8).



**Figura 8.** Alteraciones epigenéticas por metilación en neoplasias.

## Genes de Penetrancia Alta y Baja

Los genes con capacidad de penetración alta o baja causan susceptibilidad a cáncer; ejemplos de este fenómeno son enfermedades hereditarias como el cáncer colorrectal no polipósico (CCRNP) o la poliposis adenomatosa familiar (PAF), causadas por genes de alta penetración en forma autosómica dominante. Los síndromes de cánceres hereditarios familiares son el resultado de mutaciones en genes supresores. Las mutaciones en genes de alta penetración predisponen a padecer cáncer en el portador.

En el caso de los pacientes portadores de genes de baja penetración, los alelos polimorfos o combinaciones de alelos polimórficos posiblemente actúen en conjunto con factores ambientales, causando un incremento en el riesgo de padecer un cáncer.<sup>30</sup> Sin embargo, los genes de penetración alta también tienen mutaciones de penetración baja.<sup>74</sup>

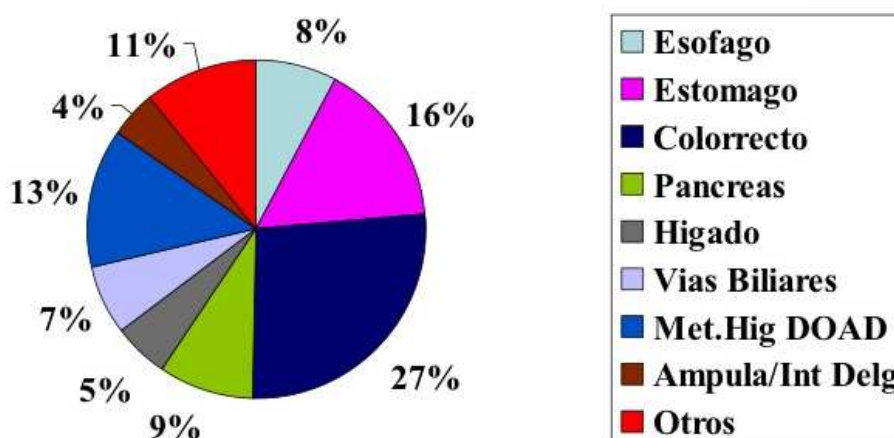
## Evidencia Epidemiológica del Cáncer Colorrectal en el Mundo y en el Hospital Universitario

El CCR es una de las principales causas de mortalidad en países industrializados y el cuarto cáncer más común en el mundo. Los más altos índices de frecuencia se registran en América del Norte, Australia y Europa y los índices más bajos en África y Asia. Cerca de 945 mil nuevos casos son diagnosticados cada año alrededor del mundo. Existen diferencias en las cifras de mortalidad que dependen de los factores socioeconómicos, dieta, longevidad, factores genéticos y la calidad de la atención médica (Tabla 2).

En México, el cáncer de colon es la cuarta neoplasia más frecuente del tracto gastrointestinal, según el Registro histopatológico de Neoplasia en México, en el año 2000 representó el 4% de todos los tumores, existe además evidencia reciente en la literatura mexicana de que el CCR es una neoplasia que ocupa el primer lugar de los tumores del tracto digestivo superando al de estómago en algunas regiones del país.<sup>168,185,203</sup>

En el Hospital Universitario Dr. José E. González de Monterrey (NL, México) según los registros de la sesión de Oncología gastroenterológica, el carcinoma de colon ocupa el primer lugar (datos no publicados) (Fig. 9).

**Tumores Malignos del Tracto Digestivo**  
**Hospital Universitario UANL Sep'02 - Sep'03**  
**N=165**

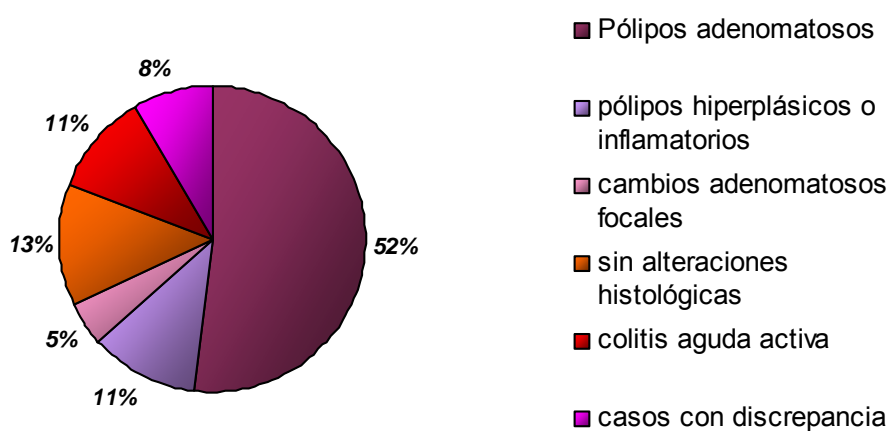


**Figura 9.** Datos de la sesión de Oncología gastrointestinal. El Cáncer Colorrectal ocupa el primer lugar en frecuencia.

Los CCR se originan de lesiones adenomatosas polipoides. La prevalencia de estas lesiones se estima en el 35% en Europa y EU, y en 10 a 15% en África y Asia. En el Hospital Universitario de la UANL, en Monterrey, desde el año 2005 al 2006 se realizó el primer estudio de detección oportuna del cáncer en la clínica de gastroenterología.

En un estudio al azar de 200 pacientes, se encontró una frecuencia del 52% (Garza *et al.*, Abstract Congreso de la Sociedad mexicana de Endoscopia 2007) (Fig. 10).

**Relacion de pacientes con lesiones colonicas**



**Figura 10.** Frecuencia de pólipos adeno-matosos en clínica piloto de detección oportuna de cáncer (n=200).

El 5% de los pólipos no tratados se estima que desarrollarán una neoplasia invasora, y este proceso llevará aproximadamente 10 años.<sup>33</sup>

Existen datos publicados en las últimas décadas, tanto en la población Americana como en población Hispana, que registran un incremento del 17% para el carcinoma de colon y un incremento del 75% del carcinoma rectal en pacientes menores de 40 años.<sup>177,243</sup>

Esto toma una gran importancia para el sistema de salud ya que existen numerosas publicaciones que catalogan los tumores colorrectales en pacientes jóvenes como neoplasias sumamente agresivas y con pobre supervivencia; dato importante para los habitantes de la región Norte de México, ya que esta área está registrada con una mayor incidencia por carcinoma colorrectal; algunas de las hipótesis relacionadas con este fenómeno son la dieta alta en carnes rojas que se da más en áreas socioeconómicas medio altas e industrializadas.<sup>187</sup>

El 69.4% de los CCR en México se presentan en pacientes mayores de 60 años y un 30.5% en menores de 50 años; en EUA, la máxima incidencia de carcinoma colorrectal es entre los 60 a 70 años y menos del 20% ocurren en menores de 50 años, un evento a resaltar epidemiológicamente pues en EUA existen programas de detección de cáncer de colon que inician a los 50 años, mientras que en México o en el norte del país no existen.<sup>180</sup> Además, existe evidencia de que la incidencia de pólipos en pacientes menores de 50 años no es rara; en nuestro hospital, en un estudio al azar demostramos una frecuencia del 40% en 250 endoscopias realizadas al azar en pacientes asintomáticos (datos no publicados).

La distribución por segmentos de carcinoma colorrectal reportado en la literatura es de un 60% en el colon izquierdo (desde la flexura esplénica hasta la línea dentada), un 35% en el colon derecho y solo del 2 al 5% de los tumores son tumores sincrónicos.<sup>196</sup>

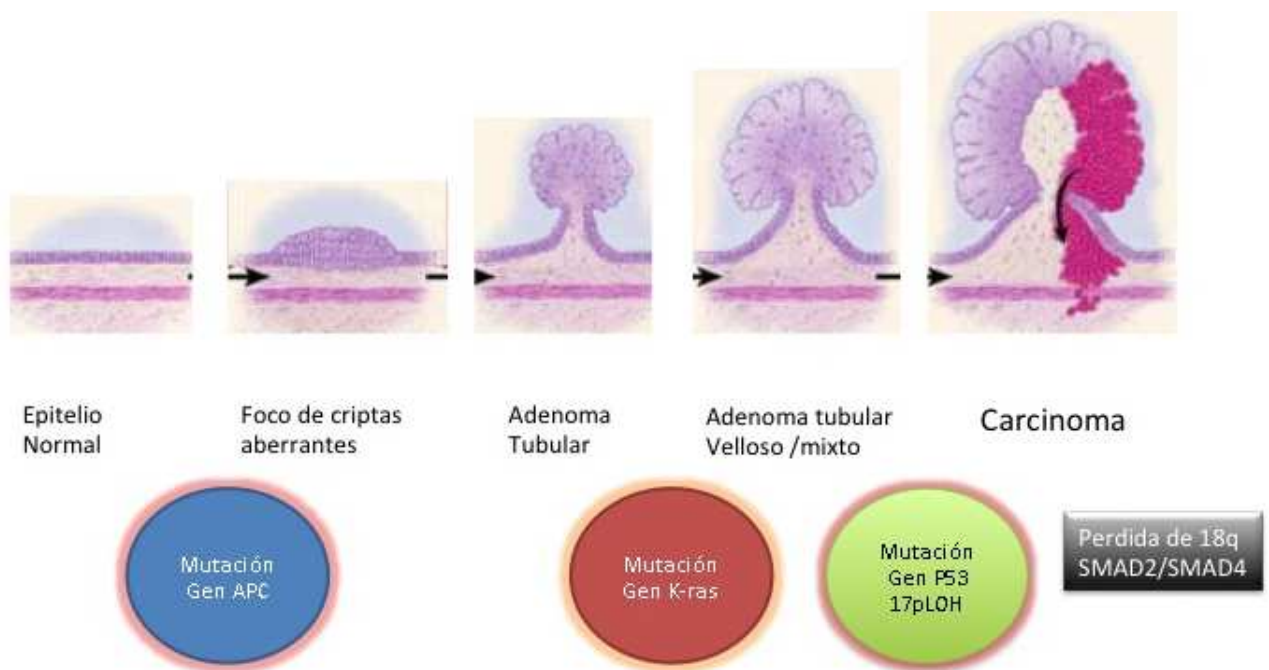
En la mayoría de los casos el diagnóstico de carcinoma colorrectal se realiza cuando éste se encuentra en etapas avanzadas, sobre todo si se tratan de carcinomas desarrollados en el colon derecho, ya que la presentación de los síntomas ocurren en etapas avanzadas y la detección por medio de endoscopia es más complicada por la localización.

Se encontró en la literatura un documento Mexicano que presenta las características clinicopatológicas en grupos de diferentes edades de CCR en forma diferencial, caracterizándolos por la localización en estadios clínicos o variedades histológicas; sin embargo, la información es parcial, sin describir variedades histológicas en forma detallada o análisis estadístico, además, no diferencia la presentación por estadio clínico o alteraciones moleculares de algún tipo.<sup>42</sup>

## Características Clinicomoleculares y Anatomopatológicas del CCR

### Poliposis Familiar Adenomatosa (PFH)

La PFH es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones en el gen APC (Fig. 11). El recto, colon y el tracto gastrointestinal alto de los pacientes con FAP tienen de cientos a miles de pólipos adenomatosos. Se deben encontrar al menos 100 pólipos en el tracto gastrointestinal para poder hacer el diagnóstico de FAP. La mayoría de estos pacientes desarrolla CCR originado de estos pólipos a los 40 años. El seguimiento mediante colonoscopia debe iniciarse a los 10 años, y después se ofrecen colectomías profilácticas.<sup>252</sup>



**Figura 11.** Vía de la inestabilidad cromosómica: Aparición de foco adenomatoso aberrante en la base de la cripta por inactivación por mutación de ambos alelos del gen APC, la mutación ulterior de un alelo del gen K-ras le confiere a las células ventajas de crecimiento con expansión clonal celular. En ciclos subsecuentes la mutación de otros genes como Smad y p53 le permiten adquirir ventajas invasivas con características aneuploides y con estabilidad de microsatélites.

Las características clinicopatológicas extracolónicas del síndrome y el número de pólipos dependen de la localización de la mutación en el gen; cuando la mutación se localiza en la porción central del gen, entre los codones 1250 a 1464, se considera severa, y es aún de peor comportamiento biológico cuando la mutación se encuentra alrededor del codón 1300.<sup>189</sup> La forma atenuada de PFA, clínicamente diagnosticada por la presencia de algunos pólipos en



el tracto gastrointestinal en la edad adulta, es causada predominantemente por mutaciones en los exones 1-4 (codones 1-158).<sup>238</sup> Una quinta parte de los pacientes clínicamente diagnosticados con PFA no son portadores de mutaciones en el gen APC.<sup>92,93</sup>

## Progresión Neoplásica en Carcinoma Colorrectal Esporádico

Aproximadamente el 40% de la población desarrollará adenomas en el colon,<sup>57</sup> sin embargo una baja proporción desarrollará un CCR. Alteraciones en la vía de señalización Wnt son las que inician los eventos moleculares en la génesis del CCR esporádico, mientras que en los pacientes con PFH las mutaciones en el gen APC favorecen la formación de adenomas.

Los pólipos adenomatosos presentan mutaciones en los genes K-ras, TP53 y en la vía de señalización del factor tumoral de crecimiento beta (TGF-beta) que promueven la progresión tumoral.<sup>66,67</sup> La progresión tumoral de los adenomas resulta en un incremento en el tamaño, grado de displasia y finalmente un carcinoma con capacidad invasora y metástasis.

La mayoría de los CCRs se desarrollan de lesiones polipoides adenomatosas preexistentes, además de variedades histológicas como los adenomas planos y los adenomas serrados.<sup>121,167</sup> Histológicamente, los adenomas se clasifican en tubulares, tubulovelloso o vellosos, los cambios vellosos y el tamaño del adenoma se asocian con displasia de alto grado y transformación maligna.

El protooncogen K-RAS y su vía de señalización celular se encuentran involucrados en la proliferación normal y diferenciación, mediando la señalización desde los factores de crecimiento hasta las vías de señalización de transducción de señales. Las mutaciones en el gen K-RAS se encuentran en el 35 a 45% de los CCRs y adenomas grandes. La ausencia de mutaciones en el gen K-RAS en adenomas pequeños es una evidencia fundamental que ilustra el papel y las ventajas de crecimiento en las células que presentan mutación de este gen (Fig. 11).<sup>154</sup>

El gen TP53 es un factor de transcripción con actividad de gen supresor tumoral, se encuentra involucrado en la transición de adenoma a CCR. La presencia de alteraciones de TP53 en los adenomas es del 4 al 26% y en los CCR del 50 al 75%. El gen TP53 puede bloquear el ciclo celular para facilitar la reparación de nucleótidos dañados en el ADN, promueve la apoptosis y, en vías alternas, inhibe la angiogénesis.<sup>156</sup>

Las mutaciones en la vía de señalización del TGF-beta que afectan en las células el crecimiento, la diferenciación, la producción de matriz extracelular, la vigilancia inmunológica y la apoptosis, también forman parte de los mecanismos de carcinogénesis en el CCR.<sup>173</sup>

Las proteínas de la familia Smad se encuentran involucradas en esta cascada. La

pérdida del cromosoma 18q ocurre en el 70% de los CCR y frecuentemente en los adenomas.<sup>66</sup> Los genes supresores mutados en el CCR en este sitio incluyen SMAD4, SMAD2 y DCC.<sup>65</sup> Las mutaciones en el receptor de tipo II TGF-beta ocurren con frecuencia en el CCR y se relacionan con la progresión de adenoma a CCR.<sup>83</sup>

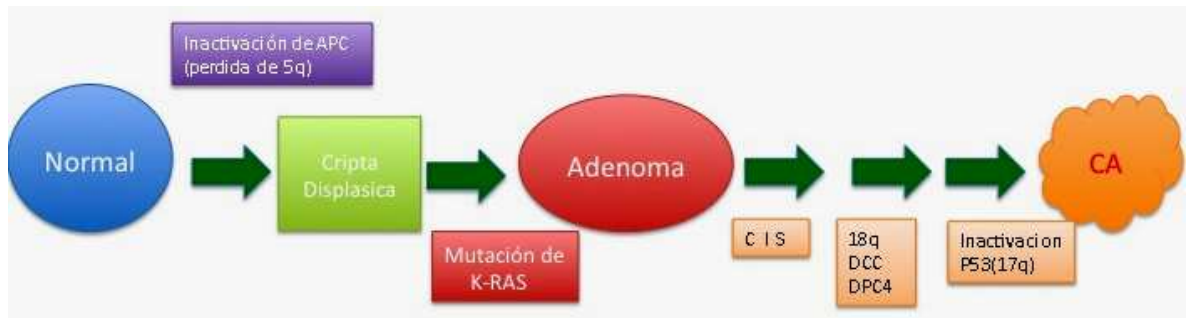
Las alteraciones genéticas que provocan inestabilidad cromosómica (INC) o inestabilidad microsatélite (IMS) favorecen la frecuencia y el número de mutaciones en pacientes con neoplasias. La mayoría de los CCRs contienen INC como ganancias o pérdida de material cromosómico o de alteración en el número de los mismos (aneuploidia).<sup>153</sup> Los eventos moleculares que delinean la INC son multifactoriales, y éstos incluyen la pérdida de la función de regulación de telómeros y alteraciones genéticas que controlan la segregación de cromosomas.

Además, se encuentran descritos defectos en el gen APC, kinasas, BUB, TP53, STK15, RB1 y BRCA1, los cuales se encuentran asociados a inestabilidad cromosómica.<sup>6</sup> La IMS es un fenómeno que ocurre en un pequeño grupo de CCRs y se presenta en las lesiones precursoras preexistentes como adenomas planos y adenomas serrados (12 a 16%).<sup>121-123,256</sup>

La presencia de IMS en CCRs se ha sugerido que es causada por una progresión rápida del CCR y produce efectos severos en la reparación del ADN. La ausencia en el mecanismo de reparación de bases (MMR) provoca acumulación de mutaciones debida a errores en la polimerización del ADN que no son reparados. Entonces, la progresión hacia carcinoma es fundamentalmente mediante mutaciones en los segmentos cortos de los genes asociados a IMS. En estos casos, las mutaciones son secundarias a la deficiencia de la función del sistema de reparación del ADN (MMR).

En el caso de tumores relacionados con carcinoma colorrectal no polipósico (CCRNP), la progresión de una célula normal a carcinoma puede durar un par de años, en lugar de 10 a 15 años en casos sin este defecto. Los CCRs esporádicos con defectos en el sistema de reparación del ADN, pueden progresar de manera rápida de una forma similar a los CCRNP.<sup>31</sup>

La teoría del reloj tumoral es una alternativa para explicar los fenómenos en la génesis del CCR esporádico. Una idea interesante es que el CCR que posee IMS puede desarrollarse sin la necesidad de la presencia de un adenoma preexistente debido a la falta total de regulación y supresión tumoral causada por la inestabilidad cromosómica (Fig. 12).<sup>140</sup>



**Figura12.** Alteraciones moleculares en el cáncer de colon esporádico.

## Reparación de Bases (MMR)

La replicación del ADN está asociada con un rango de error finito, incluyendo la incorporación de bases no semejantes (Ej.: G con A) y desviaciones en la conformación de las hebras de ADN durante la replicación (formación de curvaturas con inserciones/deleciones). El fallo en la reparación de las bases del ADN alteradas provoca mutaciones puntuales y cambios en el marco del ADN (frameshift) respectivamente. El sistema de MMR reconoce errores que eluden la función de la fidelidad de la polimerasa del ADN.<sup>171</sup>

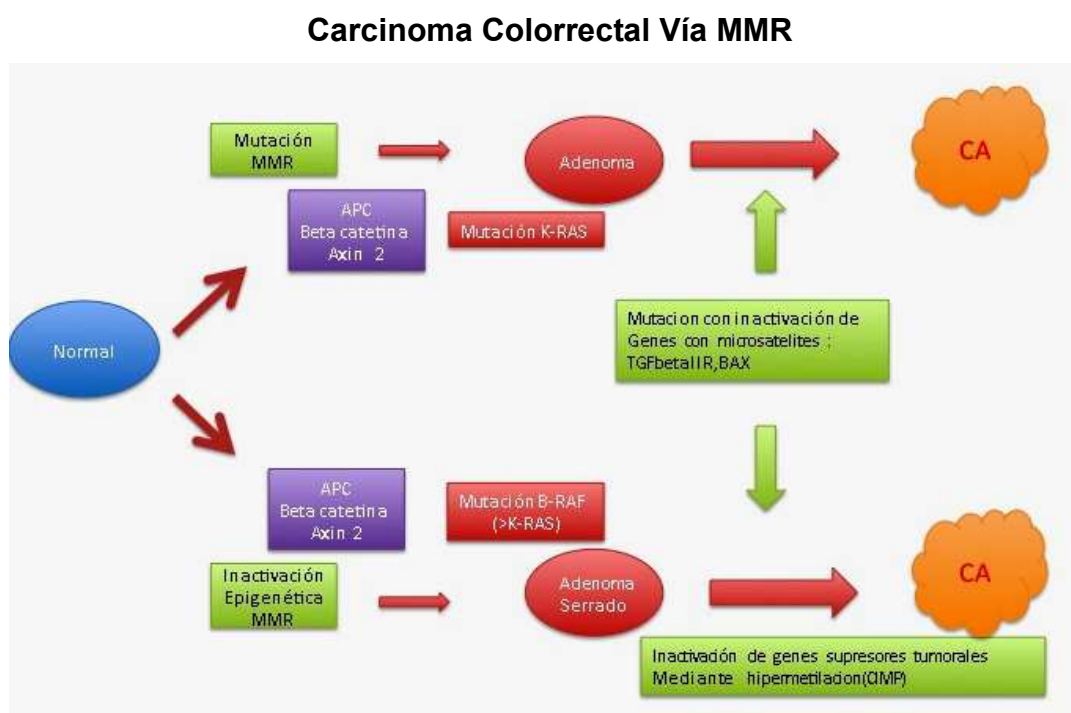
Las proteínas MMR funcionan como heterodímeros. El complejo proteico MSH2-MSH6 reconoce pares de bases en el ADN localizadas en sitios en donde no les corresponde y alteraciones de cadena de bases de inserción/delección. Este mecanismo recluta el siguiente complejo proteico MLH1-PMS2, que posteriormente activa el resto de la maquinaria del sistema de MMR. Las proteínas MSH2 y MLH1 son constituyentes dominantes de sus respectivos pares. En ausencia de su contraparte se pueden aparear con otras proteínas y crear un sistema MMR parcialmente funcional, esto explicaría en parte los casos de síndrome de CCRNP atenuado en donde existen mutaciones de los genes MSH6 y PMS2.

Las proteínas MSH6 y PMS2 son inestables en ausencia de sus respectivas compañeras dominantes (MSH2/MLH1). Esta evidencia tiene consecuencias prácticas en relación con el uso de marcaje con inmunohistoquímica de CCRs para pruebas clínicas, pues siendo MLH1 y MSH2 los orquestadores fundamentales del sistema MMR, tanto genéticamente, como en interacción proteica, los hace candidatos ideales para su búsqueda en secciones histológicas.<sup>41,122</sup>

## Inactivación de los Genes Asociados a la Reparación del ADN (MMR)

En el CCRNP la inactivación de los genes MMR se adquiere por mutación en la línea germinal, y el segundo alelo es somáticamente mutado en las células de los epitelios. Este segundo cambio de delación somática a mutación puntual o metilación del promotor, puede inactivar el alelo salvaje y posteriormente activar el desarrollo del tumor. En portadores de mutaciones en MLH1 y MSH2, la pérdida de heterocigocidad (LOH) es detectada aproximadamente en el 30% y 10%, respectivamente.<sup>207</sup>

En los pacientes portadores de la alteración en el gen MLH1, el 46% es causada por hipermetilación del promotor.<sup>146</sup> Las mutaciones puntuales en los portadores de alteraciones en el gen MLH1 son raras cuando se comparan con los portadores de mutaciones en el gen MSH2 (Yuen et al 2002 a y b). Por otro lado, los CCRs esporádicos con IMS en el 78% de los casos, tienen ausencia de expresión de MLH1 causada por metilación del sitio promotor del gen.<sup>146</sup> (Fig. 13).



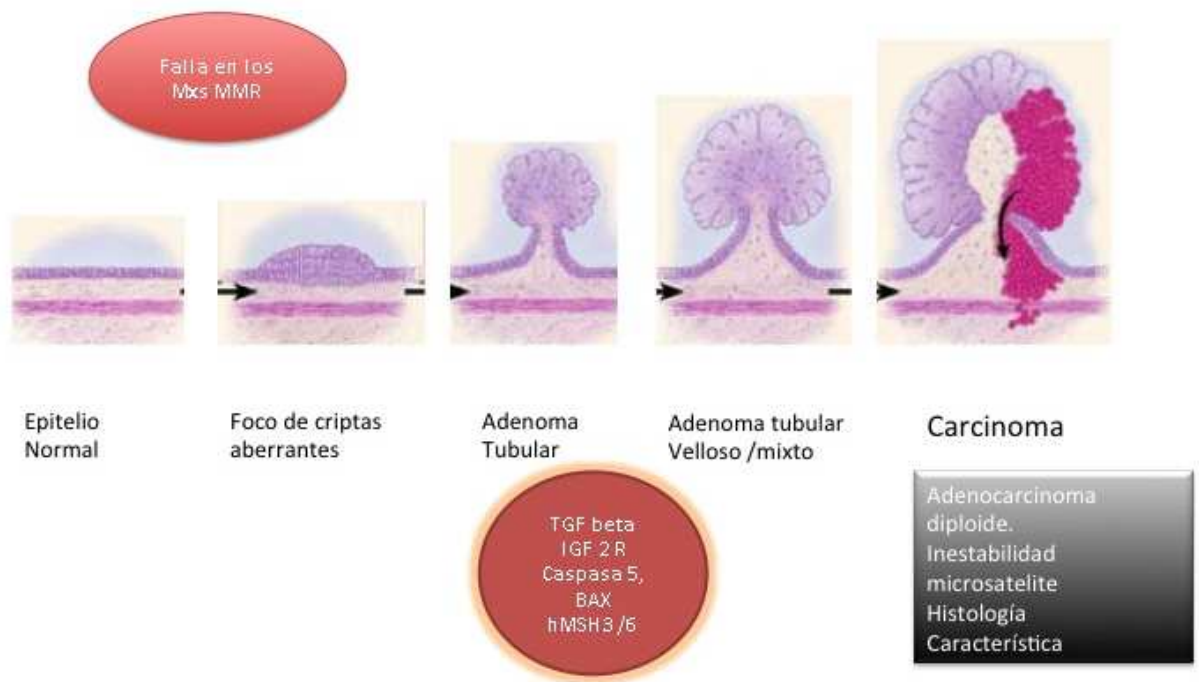
**Figura 13.** Carcinoma colorrectal esporádico con inactivación MMR y carcinoma no polipósico familiar (CCRNP).

## Inestabilidad Microsatelital

Los microsatélites son secuencias de ADN repetitivas, distribuidas en el genoma, compuestas por 1 a 6 unidades de pares de bases, las cuales se pueden repetir hasta más de 100 veces. Éstas son susceptiblemente hipermutables debido a que tienden a deslizarse por las hebras de ADN durante la replicación.

Este fenómeno se previene al mantener intacto el sistema de MMR/ADN, lo cual evita estas inserciones/deleciones de material genético. Cuando se pierde la función de estos sistemas, las cadenas no son reparadas con una resultante contracción y una expansión o contracción variable de los microsatélites. Este fenómeno es conocido como inestabilidad microsatelital (IMS), los genes que contienen secuencias simples repetitivas son susceptibles a este fenómeno.

Las mutaciones en los tumores con IMS alta, dan como resultado la pérdida de la función de un grupo bien reconocido de genes supresores tumorales en donde se incluyen el TGF beta RII, BAX, IGFRII e, interesantemente, MSH3 y MSH6.<sup>199,200</sup> (Fig. 14).



**Figura 14.** Vía de la inestabilidad microsatélite (IMS). Es causada por mutaciones en la línea germinal en unos de los genes de la reparación de bases del ADN. El fallo favorece la aparición de nuevas mutaciones, las cuales confieren a las células ventajas de crecimiento, en receptores como el factor transformante de crecimiento beta, el factor de crecimiento insulínico de crecimiento (IGF), proteínas relacionadas con la regulación de la apoptosis como bax y caspasa 5 y otras proteínas relacionadas con la reparación del ADN como MLH3 y MLH6. Esto provoca una gran cantidad de mutaciones no apareadas, que favorece la aparición de cánceres invasores diploides y con inestabilidad microsatelital.

## Cáncer Colorrectal Hereditario No Asociado a Pólipos (CCRNP)

En 1913, Warthin demostró que el CCR ocurría frecuentemente en una familia. Asimismo, encontró una asociación en frecuencia con cánceres de endometrio y estómago. Lynch *et al.*<sup>164</sup> (1966) demostraron que este síndrome se transmitía en forma autosómica dominante. Los tumores de pacientes con CCRNP son portadores de microsatélites inestables. (Fig. 14).<sup>1</sup>

Mutaciones en los genes que funcionan en la reparación del ADN, como NMLH1, MSH2, PMS2 y MSH6 fueron identificados subsecuentemente como causa del CCRNP.<sup>16,178,197</sup>

La función primaria del sistema de reparación del ADN (MMR) es eliminar el apareamiento inadecuado de bases (mismatches) y las alteraciones inserción/delección que ocurren en las bases durante la replicación del ADN (loops).<sup>200</sup>

Las alteraciones de inserción/delección ocurren como resultado de ganancias o pérdidas de pequeñas unidades repetitivas dentro de secuencias de microsatélites, conocidas también como inestabilidad microsatelital (IMS). Al menos se necesitan 6 diferentes proteínas del tipo reparador (MMR) para reconocer los errores en el ADN. La proteína MSH2 forma un heterodímero con MSH6/MSH3 dependiendo del tipo de lesión que debe de ser reparada.

MSH6 es necesaria en donde el tipo de reparación requerida es para la corrección de apareamiento inadecuado de una sola base, mientras que MSH3 y MSH6 contribuyen en la corrección de alteraciones de tipo inserción/delección.

Los estudios genéticos han demostrado que las proteínas asociadas a la reparación (MMR) y sus complejos promueven la estabilidad genómica, la falta de función de este complejo genético y proteico causa mutaciones y procesos de recombinación en el ADN, activando o silenciando genes. Estas observaciones genéticas son de relevancia directa en las fuerzas que desestabilizan el genoma que al final producen el desarrollo de un cáncer.<sup>112,202</sup> Las interacciones entre estas proteínas son claramente de importancia funcional, MSH2 y MLH 1 no son proteínas huérfanas, y tal vez interactúen en un gran número de funciones de reparación de ADN y de otras proteínas metabólicas.<sup>96</sup>

El CCRNP ocurre del 1 al 15% de todos los CCRs y la causa es una mutación en la línea germinal en los genes asociados a la reparación del ADN (MMR). El CCRNP es uno de los síndromes hereditarios más frecuentes en humanos, se caracteriza por una alta frecuencia de CCR de inicio temprano y un espectro bien definido de neoplasias extracolónicas en pacientes jóvenes (CCR, Carcinoma de endometrio, intestino delgado, uréter y pelvis renal) (menores de 50 años), la alteración se transmite en forma autosómica dominante.<sup>222,223</sup> Clínicamente, los pacientes con este síndrome son jóvenes menores de 45 años.<sup>125</sup>

La progresión de adenomas planos a carcinoma en estos pacientes es rápida, con progresión en un par de años, una vez instalado el proceso preneoplásico (promedio de 25 a 32 años).<sup>31</sup> Aproximadamente el 90% de los pacientes con CCRNP tienen inestabilidad microsatélite (IMS).<sup>160,161</sup>

La mutación en la línea germinal de cuatro de los genes relacionados con la MMR (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) confirma el diagnóstico molecular de CCRNP, y se detecta en el 80 a 90% de las familias con este síndrome.<sup>130,202,264</sup> Actualmente se han descrito más de 400 diferentes mutaciones en el sistema de MMR, en el 50% de los casos afectan al gen MLH1, en el 40% al MSH2 y, en el 10% al MSH6. En el 5% de los casos el gen PMS2 se encuentra alterado con alguno de los anteriormente mencionados.

El recientemente descrito MSH3 tal vez participe en un pequeño porcentaje de CCRNP o en un síndrome muy parecido a éste.<sup>186,274</sup> Existen variantes de la línea germinal descritas recientemente que ocurren en la patogénesis (susceptibilidad) de CCRNP. Éstas son la Exonucleasa 1 (EXO1) y la ADN polimerasa delta, sin embargo, no existe aún evidencia o suficientes estudios clínicos para avalar su papel en la génesis de CCRNP.

En la reciente revisión de la guía clínica de Bethesda (Umar et al 2004), existen descritas características clinicopatológicas en los pacientes asociadas a alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN (IMS), estas alteraciones en el funcionamiento de los genes que participan en esta importante vía que ayuda a preservar la fidelidad y la ausencia de errores en la replicación del ADN son causados ya sea por alteración en genes en la línea germinal (hereditario) o, alteraciones epigenéticas con silenciamiento de genes secundario a metilación (adquirido) (Fig. 14).<sup>121,146</sup>

Los hallazgos histopatológicos relacionados con IMS incluyen adenocarcinomas que se localizan con mayor frecuencia en colon derecho, son tumores con bordes pujantes y rara vez infiltrantes, habitualmente son poco diferenciados y mucinosos, a veces acompañados con células en anillo de sello en forma aislada o predominante, o de tipo medular con patrón de crecimiento sólido, y contienen infiltrado peritumoral linfocítico intenso o infiltrado inflamatorio linfocítico intratumoral parecido a la enfermedad de Crohn.<sup>104,123</sup>

Diversos estudios en la literatura identifican comportamientos biológicos y características diferentes en los CCR con IMS, Greenson *et al.*<sup>85</sup> (2003) sugieren que la presencia de tumores bien diferenciados con componente mucinoso habitualmente confieren alta inestabilidad microsatelital.<sup>85,277</sup>

En la experiencia de Gryfe *et al.*<sup>87</sup> (2000), las metástasis ocurren menos frecuentemente en pacientes con IMS que en pacientes con tumores con fenotipo microsatelital estable

(MSE).<sup>87</sup> Además, en algunas series se sugiere que los pacientes CCR con IMS se benefician con quimioterapia adyuvante en estadio clínico III de cáncer colorrectal.<sup>20</sup> Jenkins *et al.*<sup>125</sup> (2007) han propuesto recientemente una graduación para predecir la presencia de IMS en CCR basada en las características clinicopatológicas, edad al momento del diagnóstico, localización anatómica, subtipo histológico, grado de diferenciación, linfocitosis intraepiteliales e infiltrado linfocítico parecido a Crohn.<sup>114,115,125</sup>

Los pacientes con CCRNP tienen un alto riesgo de desarrollar CCR (80%). Además de una alta probabilidad de desarrollar un segundo carcinoma primario en el colon (metacrónico) o un CCR sincrónico, además de cáncer de estómago, endometrio y ovario. Tumores extracolónicos también han sido descritos en el tracto genitourinario, biliar, riñón, intestino delgado, cerebro y piel.<sup>2,3,147,264</sup>

El riesgo de desarrollar CCR es mayor en pacientes portadores de mutaciones de los genes con IMS del sexo masculino, cuando las mutaciones se encuentran en el gen que codifica la proteína asociada a la reparación del ADN MSH6, el CCR tiene una forma de presentación tardía (mayor de 60 años) y un fenotipo con estabilidad micro satelital (EMS)<sup>265,273,274</sup> sin embargo, estos hallazgos aún no se encuentran suficientemente validados en la literatura.

Es conocido que el CCRNP es causado por un defecto en la vía de reparación del ADN al momento de la replicación celular y de igual forma que los carcinomas esporádicos, los genes afectados con mayor frecuencia son el hMSH2 y hMLH1. La historia familiar de carcinoma colorrectal es indispensable para poder hacer el diagnóstico de carcinoma con IMS o CCHNP.<sup>121,264</sup>

La gran mayoría de los CCHNP presentan IMS (85%), sin embargo esta misma alteración se ha observado en un 10-20% de los carcinomas colorrectales esporádicos. Los primeros estudios de IMS se realizaron en pacientes con CCRNP con técnicas de PCR, no obstante, este es un estudio de coste elevado y poco práctico implementarlo en todos los laboratorios de patología quirúrgica.<sup>81</sup> Actualmente se realiza la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) para detectar los casos de IMS. Stahl<sup>241</sup> (2000) en una crítica de literatura, refiere que encontraron una correlación del 100% entre los resultados moleculares para IMS y la técnica con inmunohistoquímica.<sup>241</sup>

En la búsqueda de IMS en carcinoma colorrectal es necesario demostrar la presencia o ausencia de 2 proteínas con un patrón de tinción nuclear que corresponden a los genes relacionados con IMS, y éstos son MSH2 y MLH1 que son los responsables del 90% de las IMS. La ausencia de tinción nuclear para cualquiera de estas dos proteínas, en las células



neoplásicas del CCR, producto de las alteraciones respectivas en sus genes por daño en la línea germinal o por silenciamiento del gen por metilación, es considerado como IMS.<sup>232</sup>

Varios autores están de acuerdo en que es preferible utilizar la técnica de IHQ en laboratorios de patología, porque ofrece excelentes resultados, como un método de selección de pacientes para estudios moleculares.<sup>81,94,106</sup>

Existen un gran número de términos utilizados en la literatura para los pacientes que presentan IMS, dependiendo de la metodología usada para buscar la alteración genética. El término de inestabilidad microsatélite, de alta o baja frecuencia, sólo es posible establecerla por medio de estudios moleculares (PCR), la inestabilidad microsatelital de baja frecuencia no es posible establecerla por métodos de inmunohistoquímica.

Gryfe *et al.*<sup>87</sup> (2000) refieren que aún es desconocido el significado clínico-patológico de la IMS de baja frecuencia. Además, consideran que los carcinomas colorrectales con IMS en forma hereditaria o esporádica constituyen clínica y molecularmente un subtipo diferente de carcinoma.<sup>87</sup> Aunque la IMS ha sido documentada en el 10 al 15 % de los casos esporádicos sin CCRNP, las mutaciones somáticas de MLH1 o MSH2 son encontradas rara vez en este grupo de pacientes.<sup>210</sup> La mayoría de los autores están de acuerdo en que los CCR que presentan IMS son clínica, morfológica, molecular e histopatológicamente diferentes.

Los criterios clínicos facilitan la identificación de pacientes con CCRNP y sus características moleculares. El 85 a 90% de los pacientes con CCR asociado a CCRNP son portadores de IMS, son necesarias, por tanto, metodologías para buscar esta alteración e identificar estos grupos de riesgo.

La guía de Bethesda se introdujo con la intención de identificar pacientes con CCRNP que deben ser investigados en búsqueda de IMS. Esta guía incluye características clínicas y patológicas que no se incluyen en los criterios de Ámsterdam, lo cual la hace más flexible para identificar pacientes con riesgo de CCRNP; otra característica es que permite incluir familias pequeñas con poco seguimiento, por supuesto que en este grupo de pacientes otro de los criterios de selección incluye no tener carcinoma de colon asociado a pólipos.

## **Características Clínicas y Patológicas del Síndrome de Lynch**

La susceptibilidad genética más frecuente para desarrollar CCR es el Síndrome de Lynch (SL), conocido como CCRNP, la frecuencia de esta entidad es del 3% de todos los CCR y en el 2% de los carcinomas de endometrio.<sup>94</sup> La frecuencia del SL es considerablemente más alta que estas frecuencias debido a que un 30% de pacientes jóvenes se presentan como neoplasias malignas a edad temprana en forma sincrónica o metacrónica.<sup>165,268</sup>

Los pacientes con LS tienen un riesgo del 20 al 70% de desarrollar neoplasias extracolónicas (estómago, intestino delgado, páncreas, tracto biliar, ovario, cerebro, tracto urinario y piel). El SL es causado por mutaciones en la línea germinal de los genes de reparación de ADN (MMR).<sup>3</sup> El diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza al demostrar la inactivación por mutación de uno de los genes relacionados con MMR, MLH1, MSH2, MSH6 o PMS2.

La detección temprana de estos pacientes portadores de mutaciones en los genes de MMR, particularmente si son asintomáticos, es de gran importancia por lo anteriormente descrito. Está demostrado que el seguimiento con endoscopia reduce del 65 al 70% la morbimortalidad por CCR,<sup>247</sup> y la cirugía profiláctica de los ovarios previene el desarrollo de cáncer endometrial y de ovario.<sup>225</sup>

A pesar de existir una descripción clara y precisa del SL, la frecuencia con la que estos pacientes no son diagnosticados adecuadamente es la regla, además de presentarse con neoplasias malignas en estadios avanzados de enfermedad y olvidar el beneficio que se les otorga al estudiar a sus familiares. El diagnóstico debería ir precedido de una evaluación de características clínicas y patológicas para su adecuada estratificación de riesgo y seguimiento. La presencia en un paciente joven de 1 o 2 neoplasias, historia familiar y las características histológicas del tumor (mucinosos, en anillo de sellos, con patrón medular, etc.), son características que favorecen el diagnóstico de SL y obliga a un estudio molecular genético y de los miembros de la familia.<sup>214</sup>

## Diagnóstico de Pacientes con Síndrome de Lynch

En 1990 se publicaron los criterios de Ámsterdam en un intento de identificar pacientes con esta entidad, favoreciendo el inicio de estudios moleculares y estrategias para el diagnóstico de pacientes con SL y encontrar el gen relacionado con la enfermedad. Estos parámetros se clasificaron como muy específicos, sin embargo, son poco sensibles, a pesar de su modificación en 1999.<sup>139</sup>

En 1997 se publicó la guía de Bethesda<sup>216</sup> con el objetivo de seleccionar pacientes en cuyos tumores se debería analizar la posibilidad de IMS, para identificar pacientes portadores de la mutación. En 2004, se realizó una segunda modificación<sup>257</sup> con la finalidad de darle un aplicación más clínica, pues no sólo está hecha para los pacientes con historia familiar de cáncer, si no que incluye características clinicopatológicas de pacientes que pudieran ser potencialmente candidatos a tener la enfermedad. Los parámetros se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Criterios de Bethesda revisados en 2004.

<b>Pacientes con cualquiera de las siguientes características deben ser estudiados para IMS</b>
1.- CCR diagnosticado antes de los 50 años
2.- Presencia de CCR sincrónico, metacrónico, o cualquier otro carcinoma relacionado con síndrome de Lynch, independientemente de la edad
3.- CCR con histología de IMS alta (MSI-H) en pacientes menores de 60 años
4.- CRC en 1 o más de familiares en primer grado con un tumor relacionado con síndrome de Lynch con uno de los cánceres diagnosticados antes de los 50 años
5.- CCR diagnosticado en 2 o más familiares en primer o segundo grado con tumores relacionados con síndrome de Lynch, independientemente de la edad

En 2005 el grupo holandés desarrolló una nueva estrategia de selección de pacientes (Criterios de MIPA). En ésta, el patólogo selecciona el paciente dependiendo de la presencia de los siguientes criterios para análisis de IMS: 1.- CCR antes de los 50 años. 2.- Dos tumores asociados, incluyendo sincrónicos o metacrónicos CCR o tumores relacionados con SL. 3.- Presencia de adenomas antes de los 40 años. Estos criterios son eficientes y efectivos en la práctica diaria.<sup>35</sup>

En este grupo además, en forma rutinaria, los patólogos en todos los pacientes con CCR o cáncer endometrial menores de 50 años, solicitan inmunohistoquímica para las proteínas de reparación (MMR), o cualquier paciente con tumores relacionados con síndrome de Lynch, antes de los 70 años.

### **Bases Moleculares del Síndrome de Lynch y Tumores Esporádicos con Deficiencia de Mecanismos de Reparación de ADN (MMR)**

El síndrome de Lynch es causado por mutación en la línea germinal de los genes MLH1 y MSH2 en el 90% de los casos<sup>263</sup> y, en menor frecuencia, en MSH6 y PMS2 de eliminación y corrección de bases de nucleótidos.<sup>212</sup>

Los pacientes con SL desde el nacimiento tienen una mutación en la línea germinal de los genes MMR y adquieren la inactivación del segundo alelo salvaje en sus tumores.<sup>145</sup> La

inactivación de este segundo alelo ocurre casi exclusivamente por una pequeña mutación o pérdida parcial del gen, e inactivación bialélica que promueve la completa inactivación de la proteína funcional.

La consecuencia es un sistema de reparación de ADN no funcional y con incapacidad para ejercer sus funciones de eliminación de bases de nucleótidos localizadas en sitios no apropiados en el ADN o de reparar las pequeñas inserciones o deleciones de bases que ocurren normalmente durante la replicación del ADN.<sup>259</sup>

Los mecanismos mediante los cuales se repara el ADN están ampliamente descritos en la literatura. El MSH2 (mutS homolog 2) forma un heteródmero con MSH6 (mutS homolog 6), que se desliza a través del ADN como una pinza identificando cada nucleótido mal apareado y detecta inserciones pequeñas y deleciones.<sup>275</sup> MLH1 (mutL homolog 1) dimeriza con PMS2 (segregación postmeiotica 2) y se une al complejo formado por MSH2 y MSH6.

En conjunto estas 4 proteínas reclutan a la exonucleasa para realizar la reparación del ADN.<sup>86</sup> Analizando este mecanismo, si cualquiera de las cuatro proteínas antes descritas es funcionalmente inactiva, los nucleótidos no pareados adecuadamente no se reparan. La disfunción del sistema de reparación del ADN (MMR) favorece el rango de mutaciones y permite a la célula ser vulnerable a mutaciones en genes que controlan el crecimiento celular incluyendo genes supresores tumorales y oncogenes, incrementando el riesgo de desarrollar una neoplasia.

La presencia de un tumor con IMS es un marcador de un sistema de reparación del ADN no funcional. Es un sistema que se encuentra con mayor frecuencia alterado en los tumores relacionados con el SL (95%); sin embargo, es un marcador con una limitada especificidad para este síndrome, pues el 15% de los CCR pueden también presentar un fenotipo de IMS. Este fenómeno es causado por la hipermetilación del promotor del gen MLH1.<sup>108,135</sup> La metilación del ADN es una modificación epigenética del ADN la cual se inserta en los residuos de citosina de los dinucleótidos CpG denominados regiones CpG, localizadas en el 40% de los promotores de los genes humanos, incluyendo el gen MLH1.<sup>107</sup>

La hipermetilación de las regiones CpG en los promotores de MLH1 provoca una inhibición de la transcripción del gen imitando una inactivación (mutación). En el caso de que las dos copias estén inactivadas (hipermetilación bialélica), la función de MLH1 se pierde. Esto provoca tumores con IMS sobre todo en pacientes ancianos.<sup>108</sup>

La activación de mutaciones específicas en el oncogén BRAFv600, pueden ser detectadas en el 40 a 87% de los CCR con IMS. La mutación en el oncogén BRAF solo ha sido demostrada en un solo caso de síndrome de Lynch en numerosas series de pacientes.<sup>183</sup> Este

descubrimiento favorece la teoría de que la presencia de mutación de BRAF en pacientes con CCR con IMS está relacionada con la metilación de la región promotora de MLH1 en CCR esporádico.<sup>83,166</sup>

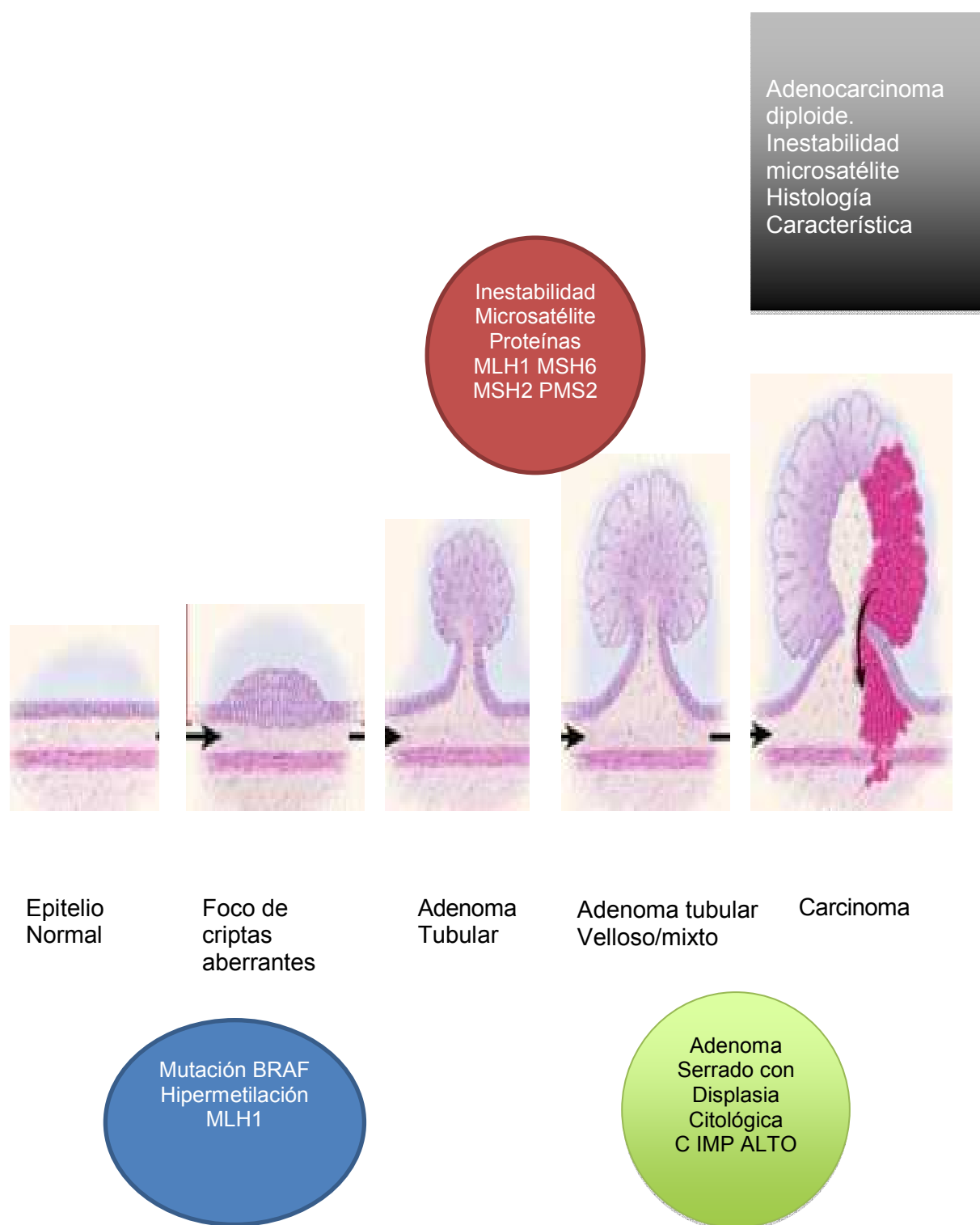
Teóricamente, y siguiendo esta línea, la presencia de mutación en BRAFv600 puede ser usada para identificar tumores con IMS, aunque es mucho más sensible investigar la hipermetilación del promotor de MLH1.<sup>174</sup> Además de las formas esporádicas de hipermetilación de MLH1 también se ha encontrado la hipermetilación en la línea germinal de MLH1 con grados de mosaicismo, que funcionalmente es similar a la inactivación por mutación y produce un fenotipo parecido al SL.<sup>110</sup>

Aunque es muy rara la presencia de metilación del promotor de MLH1 en la línea germinal, debe de ser considerada en pacientes jóvenes con tumores con IMS sin historia familiar o con pérdida de la expresión de MLH1.<sup>111</sup>

## **Cáncer Colorrectal, IMS y BRAF. Características Histopatológicas en Pacientes Jóvenes**

El CCR en pacientes menores de 50 años varía en frecuencia del 4% al 25%,<sup>129</sup> sin embargo, no hay un consenso acerca de cuál es el punto de corte para considerar “joven”, los criterios de Ámsterdam y de Bethesda sugieren la edad de 50 años. Estudios previos en México de la frecuencia de CCR han obtenido porcentajes alrededor del 40% en pacientes menores a los 50 años, una incidencia más alta en comparación con otras publicaciones.<sup>64,243</sup>

En cuanto a las características histopatológicas, no existen diferencias significativas en cuanto a la localización, sin embargo hay una tendencia marcada a presentarse con mayor frecuencia en colon distal y recto, con estadios más avanzados; con respecto al pronóstico existe controversia, ya que la supervivencia a cinco años depende de la región del estudio.<sup>177</sup>



**Figura 15.** Se esquematizan las alteraciones y progresión neoplásica de tumores con IMS.

En un estudio previo en nuestro hospital, que dividió los pacientes en tres grupos por edad y localización, se observó un predominio en el sexo masculino (68.1%) para los pacientes

jóvenes, con una predilección por la localización izquierda; para el resto de los grupos no se observó diferencia en la frecuencia por sexo.

Los pacientes jóvenes con localización derecha (GI), mostraron un predominio de tumores poco diferenciados (57.1%) mientras que los pacientes jóvenes de localización izquierda (GII) y los pacientes mayores de 50 años (GIII) presentaron un predominio de tumores moderadamente diferenciados, 54.5% y 81.4%, respectivamente. En el grupo I la correlación con grado histológico fue significativa ( $p=0.021$ ). En todos los grupos, las diferencias observadas fueron significativas entre sí en localización ( $p<0.0001$ ) y tamaño del tumor ( $p=0.035$ ) pero no para la edad.<sup>266</sup>

En la población general, cerca del 85% de los CCR ocurren de manera esporádica y en el resto existe un antecedente familiar, lo que sugiere un componente genético. Es conocido que existen al menos dos vías diferentes para la génesis del CCR esporádico; la más común, denominada vía de la inestabilidad microsomal, representa el 85% de los casos y se encuentra relacionada con pérdida de la heterozigocidad, amplificaciones cromosomales y translocaciones que afectan principalmente los genes supresores de tumor (APC, p53, SMAD4) y oncogenes como el K-ras.

La vía de la inestabilidad microsatélite (IMS) es el 15% restante, y se refiere a los cambios en la longitud (inestabilidad) de las secuencias de repetición de nucleótidos cortos (microsatélites), cuando se comparan con el ADN normal. Durante la replicación del ADN, los microsatélites son más susceptibles a la ruptura, y son normalmente reparados por el complejo de genes reparadores de ADN, de los cuales al menos siete han sido identificados: hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS2, hPMS1 y hMLH3.

Las proteínas funcionan formando los dímeros MLH-1/PMS2 y MSH-2/MSH-6, la falta de expresión de las proteínas obligadas MLH-1 y MSH-2 ocasiona la degradación de la proteína no apareada, sin embargo las proteínas secundarias MLH-6 y PMS2, pueden ser substituidas por otras proteínas del complejo, sin afectar la estabilidad del dímero. Las alteraciones en los genes traen como consecuencia, ya sea la falta absoluta de expresión o la expresión de proteínas truncadas o no funcionales que son degradadas rápidamente.

En el carcinoma colorectal hereditario no polipósico (CCHNP), es una condición que representa del 2 al 5% de los CCR, y que tiene como característica la mutación en la línea germinal que inactiva los genes reparadores de ADN. En el 94% de los casos se encuentran alterados los genes MLH1 y MSH2 y el resto corresponden a mutaciones que involucran los genes MSH6 y PMS2. Por otro lado entre el 10 y 15% de los CCR esporádicos tiene

inestabilidad microsatélite por inactivación del gen hMLH1 debido a la hipermetilación de su promotor.

Las mutaciones en el “hotspot” v600E del gen BRAF están asociadas exclusivamente a CCR de tipo esporádico por inestabilidad microsatélite secundaria a metilación,<sup>58</sup> esta mutación es excluyente tanto de la mutación de K-ras, como de mutación de línea germinal de los genes de reparación del ADN.<sup>109</sup> Por lo tanto, la ausencia de mutación de BRAF en CCR sugiere dos posibilidades en pacientes con CCR, por un lado cuando se presenta en jóvenes un probable CCRNP y, cuando se encuentra en pacientes mayores de 50 años, la posibilidad de una alteración epigenética de los genes asociados a IMS.

Entre los métodos utilizados para la detección de CCRs con alteraciones en las proteínas de reparación del ADN, se encuentran los criterios clínicos (Ámsterdam II /Bethesda), las características histopatológicas de los tumores, la detección de la expresión de las proteínas por inmunohistoquímica (MSH2,MLH1) y el análisis de secuencias microsatélite mediante PCR, estos dos últimos métodos tienen una sensibilidad mayor al 90% y no son excluyentes el uno del otro en el estudio de estos pacientes; el primero se utiliza como método de tamizaje y diagnóstico (con criterios de Bethesda) o para la indicación de análisis molecular para corroborar el diagnóstico de un síndrome de Lynch (CCRNP).<sup>39,261</sup>

En 1996, Leach *et al.*<sup>152</sup> y Thibodeau *et al.*<sup>253</sup> publicaron el uso de anticuerpos monoclonales MLH1 y MSH2 para el análisis y búsqueda de CCRs con alteraciones en la MMR, e inestabilidad microsatelital mediante inmunohistoquímica. Actualmente se recomienda la técnica de IHQ para detectar los casos de IMS.

Utilizando detección por inmunohistoquímica con anticuerpos para hMLH-1 y hMSH2 se puede obtener una concordancia del 93% con el análisis de secuencias microsatélite con métodos de biología molecular, y ésta aumenta con el uso de MSH-6 y PMS2; además, tiene como ventaja, dirigir la secuenciación de ADN del gen con expresión alterada de su proteína, es más rápido, barato y reproducible.<sup>246</sup>

La sensibilidad de la inmunohistoquímica es baja cuando los defectos en los genes MMR son parciales (alteración epigenética por metilación) o existen proteínas no funcionales truncadas (wild type), que favorecen la posibilidad de resultados falsos, negativos o positivos; sin embargo, Stahl (2000), en un metanálisis de la literatura, sugiere que la inmunohistoquímica es un buen método de tamizaje para la selección de pacientes para estudios moleculares y, recientemente, las guías de Ámsterdam (criterios de MIPA) los incluyen como métodos de selección de pacientes para estudio de síndrome de Lynch.<sup>35</sup>



En la detección de IMS en carcinoma colorrectal es necesario realizar al menos 2 marcadores (MSH2 y MLH1) que son los responsables del 90% de los casos IMS. El resultado de IMS se considera positivo cuando uno de los marcadores no se expresa en el núcleo de las células del tejido neoplásico (no tinción). El acuerdo general en la literatura establece que es preferible utilizar la técnica de IHQ en laboratorios de patología, como una prueba de cribado en búsqueda de alteraciones en el patrón de expresión de proteínas relacionadas con IMS, por ofrecer excelentes resultados a un bajo costo.<sup>81,106</sup>

La mayoría de los CCRs con IMS en jóvenes muestran características clínicas, morfológicas, histopatológicas y moleculares especiales. Los tumores con IMS, se presentan en edad temprana de la vida (menores de 50 años), son tumores con localización proximal (antes de la flexión esplénica), con frecuencia desarrollan tumores sincrónicos o metacrónicos, tienen mejor pronóstico que los carcinomas esporádicos, pobre respuesta a la quimioterapia adyuvante, ausencia de múltiples pólipos, patrón hereditario autosómico dominante y contenido de ADN diploide.

La mayoría son tumores exofíticos y están asociados a abundante necrosis; histológicamente son tumores poco diferenciados, variedad mucinosos, de células en anillo de sello, indiferenciados o con componentes microglandulares. Un rasgo característico es un infiltrado linfocitario parecido al de Enfermedad de Crohn.<sup>138</sup>

Todas estas características clínico-patológicas se encuentran presentes en la mayoría de los estudios realizados, sin embargo existen trabajos en donde los hallazgos patológicos no se correlacionan con los hallazgos característicos de los carcinomas colorrectales con IMS.<sup>72</sup>

El seguimiento de los pacientes con IMS y de sus familiares es diferente al resto de los carcinomas colorrectales. Actualmente se han publicado numerosas propuestas para el seguimiento y se han implementado protocolos para hacer detección temprana de pacientes con riesgo para desarrollar carcinoma colorrectal.

La detección de IMS se realiza clínicamente, con los criterios de Bethesda y el diagnóstico definitivo se realiza con estudios moleculares con PCR o IHQ en el caso de cribado de pacientes para estudio molecular. Esto es de importancia ya que los pacientes que presentan una prueba positiva para mutación en la línea germinal (IMS) demostrada por PCR, tienen un riesgo aproximado del 90% de desarrollar cáncer y carcinomas sincrónicos y metacrónicos.

Los estudios de IHQ para la detección de IMS proporcionan información pronóstica, de predisposición genética y de predicción de riesgo para desarrollar carcinomas metacrónicos,

todo esto a un bajo costo y en un tiempo aproximado de 24 horas. En nuestro servicio realizamos estas pruebas desde 1998.

## **BRAF y Adenocarcinoma Colorrectal**

BRAF es un miembro de la familia de genes RAF, los cuales codifican una quinasa treonina/serina citoplásmica, que es un componente esencial en la vía de señalización de proteínas quinasas con actividad mitogénica. Las mutaciones en el gen BRAF, predominantemente en el codón 599, se detectan en el 15% de los CCR,<sup>205</sup> la frecuencia de mutaciones en el gen BRAF en carcinomas colorrectales esporádicos con IMS y con MSE ocurren en el 31% y 7%, respectivamente.<sup>211</sup>

La mayoría de las mutaciones en BRAF son un cambio de una base timina por adenosina en la posición del nucleótido 1796, causando la substitución de un residuo de aminoácido 599 valina por glutamato (V599E). En CCRs esporádicos las mutaciones en K-ras y BRAF se presentan en el 30 y 10% de los casos, respectivamente.<sup>192-194</sup> Yuen *et al.*<sup>279</sup> (2002), demostraron en su estudio que se encuentran mutaciones del gen BRAF en el 5.1% de los CCRs.<sup>278,279</sup>

Iacopetta *et al.*<sup>118</sup> (2006) observaron que la frecuencia de mutaciones en BRAF V599 es un fenómeno común en pacientes con CCRs esporádicos mayores de 56 años (61%), mientras que en pacientes menores de 55 años la frecuencia es del 7%, sugiriendo que la edad es un factor que influye en la presencia de estas mutaciones. Asimismo, otros estudios han demostrado la ausencia de Mutaciones de BRAF en pacientes con CCRNP, lo cual implica la posibilidad de búsqueda de esta mutación como una metodología para detectar pacientes con CCRNP, además de los criterios clínicos y la investigación de ausencia de proteínas asociadas a la MMR (MSH2/MLH1) en el tejido neoplásico de pacientes con CCRs.<sup>55,147</sup>

Los mecanismos por los cuales hMLH1 es silenciado y BRAF mutado en los CCR esporádicos son mediante metilación, y su asociación con mutaciones en otros genes genera la progresión tumoral y metástasis en CCR. En el caso de los CCRNP este evento molecular no sucede y el daño en los genes MMR es heredado por mutaciones en la línea germinal, con esto se concluye que las mutaciones de BRAF en pacientes con CCRNP son inexistentes. Esto sugiere el potencial uso de BRAF como una prueba de selección de pacientes y familiares con CCRNP.<sup>55</sup> La mutación del BRAFv600E es detectada con la misma especificidad y sensibilidad por PCR con secuenciación automática y por PCR en tiempo real.<sup>17</sup>

## JUSTIFICACIÓN

El CCR es un problema de salud mundial. En las secciones anteriores hemos descrito las bases moleculares y la génesis del CCR; asimismo, hemos descrito la necesidad de encontrar una forma más efectiva de localizar pacientes jóvenes con alteraciones moleculares relacionadas con Síndrome de Lynch. El mecanismo básico en estos tumores es la inestabilidad microsatelital, sin embargo, ésta no es un fenómeno que ocurra solo en pacientes con Síndrome de Lynch lo que dificulta su estudio y detección.

Los pacientes jóvenes menores de 50 años con CCR son candidatos a la investigación de la expresión de proteínas de la reparación MLH1 y MSH2 mediante inmunohistoquímica y mutación del oncogén BRAFv600 pues son un grupo potencial de riesgo para presentar tumores con inestabilidad microsatélite (IMS), la ausencia de mutación en el gen BRAF por si sola es un indicio fuerte de la posibilidad de presentar síndrome de Lynch.

Esta descripción de evidencia y datos no ha sido investigada en México y representa un estudio novel en la descripción de hallazgos clinicopatológicos y moleculares de CCRs en pacientes jóvenes.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS

En los pacientes con cáncer colorrectal (CCR) la edad está relacionada con la alteración de la expresión de las proteínas asociadas a reparación del ADN, MLH1 y MSH2, y con el estado mutacional del gen BRAF (v600E)

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Conocer entre los pacientes menores de 50 años, las características histopatológicas principales y su relación con las alteraciones en la expresión de las proteínas de reparación del ADN (MLH1, MSH2) y la presencia de mutación en el gen BRAF (v600E), correlacionando estos hallazgos con un grupo control de pacientes con CCR mayores de 50 años y determinar si la edad se relaciona con la alteración en la expresión de las proteínas asociadas a reparación del ADN y al estado mutacional del gen BRAF (v600E).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Primero.-** Describir las características clinicopatológicas del CCR en pacientes jóvenes, menores de 50 años, en una población del Noroeste de México y la expresión de proteínas asociadas a la inestabilidad microsatelital MLH1 y MSH2.

**Segundo.-** Comparar las diferencias histopatológicas y por estadio clínico entre pacientes jóvenes y adultos, así como la frecuencia de expresión de proteínas asociadas a inestabilidad microsatelital MLH1 y MSH2.

**Tercero.-** Investigar el valor del Análisis mutacional de BRAF como prueba única en la detección de pacientes con inestabilidad microsatelital asociada a carcinoma colorrectal no asociado a pólipos (CCRNP).

**Cuarto.-** Describir los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos de MSH2 y MLH1 y mutacionales de BRAF en pacientes con cánceres de colon sincrónicos, metacrónicos o con segundas neoplasias, así como antecedentes de neoplasias en sus familias con lo cual evidenciamos la presencia de un grupo de pacientes con síndrome de Lynch no reportado antes en el Noreste de México.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **MATERIAL**

### **Selección de Material para Estudio**

Se seleccionaron de los archivos de patología del Hospital Universitario Dr. José E. González, de Monterrey, pacientes con CCR entre los años 1986 y 2009, los criterios de inclusión fueron:

1. Contar con material histopatológico en laminillas y bloques para su revisión.
2. Informe histopatológico.
3. Material adecuado para la realización de inmunohistoquímica.
4. Tumor viable en más del 50% del material revisado para análisis mutacional de BRAFv600E.

Las muestras se obtuvieron desde enero de 1986 hasta agosto de 2009, de los archivos de anatomía patológica del hospital. Se recolectaron 426 especímenes con diagnóstico de CCR; de éstos, 106 casos fueron resecciones quirúrgicas por adenocarcinoma de colon en pacientes menores de 50 años (24.8%).

En nuestro hospital, desde enero del año 2000, se realiza a todos los pacientes menores de 50 años el cribado con inmunohistoquímica para detectar defectos en la expresión de las proteínas asociadas a reparación del ADN (MLH1 y MSH2), de manera rutinaria. Por esta razón, los casos de pacientes menores de 50 años desde enero de 1980 a enero de 2000 se recabaron de manera retrospectiva, y de manera prospectiva aquellos desde enero de 2000 a agosto de 2009. Este trabajo es, por tanto, un estudio prospectivo, retrospectivo, observacional y comparativo.

### **Selección de Casos en Forma Retrospectiva**

Se revisaron los archivos del servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario "Dr. Eleuterio González" de Monterrey en el periodo de 1980 a 2000. Se seleccionaron todos los casos diagnosticados como adenocarcinoma de colon que cumplieran los siguientes requisitos: 1) Que fuesen resecciones por adenocarcinoma de colon. 2) Que contaran con un diagnóstico histopatológico completo. 3) Que contara con los datos del paciente, de la pieza quirúrgica y del tamaño tumoral. Y 4) Que contara con las secciones y los boques de parafina.

Los casos seleccionados se clasificaron en tres grupos:

**Grupo I:** Pacientes menores de 50 años con localización tumoral en el lado derecho.

**Grupo II:** Pacientes menores de 50 años con tumores de localización izquierda.

**Grupo III:** Pacientes mayores de 50 años con localización del tumor en cualquier segmento del colon.

Los portaobjetos con las secciones de las muestras de estos pacientes fueron reevaluadas con la tinción de hematoxilina y eosina por un patólogo experto en el área y se reclasificaron según la clasificación de la OMS para la variedad histológica, el grado de diferenciación, el grado de infiltración y el estadio de los ganglios linfáticos. Todo ello se determinó según los criterios de la AJC (American Joint Committee on Cancer); así mismo, se reevaluó la clasificación de Astler y Collier. Se realizó una revisión sin tener en cuenta la edad de los pacientes para evaluar de forma general los datos de nuestro universo de pacientes y, posteriormente, se realizaron comparaciones entre los grupos de edad. Se realizó un análisis estadístico de las variables con el método de Chi cuadrado.

## **Selección de Material y Metodología de Estudio de CCR en Pacientes Menores de 50 Años y Mayores de 50 Años**

En este estudio se compararon 2 grupos de pacientes, tomando como referencia la edad de 50 años, que es uno de los criterios de Bethesda para el cribado molecular de pacientes con probabilidad de presentar síndrome de Lynch (CCRNP).

En el proceso de este estudio, además, se investigó la presencia de tumores sincrónicos, metacrónicos o segundas neoplasias, siguiendo los criterios de Bethesda (ver Tabla 4), con el objetivo de documentar pacientes con CCR con IMS y registrar los hallazgos anatomopatológicos de pacientes portadores de probable síndrome de Lynch.

Los casos fueron reevaluados mediante el estudio del informe histopatológico y las secciones, revisándose un promedio de 17 secciones por caso (promedio 10) las cuales incluían, al menos, 4 secciones histológicas del tumor y los ganglios linfáticos.

En cada caso se obtuvieron las siguientes variables:

- Edad
- Sexo
- Localización
- tamaño tumoral
- tipo histológico



- grado de infiltración
- estadio de Astler y Collier
- número de ganglios positivos
- presencia de pólipos

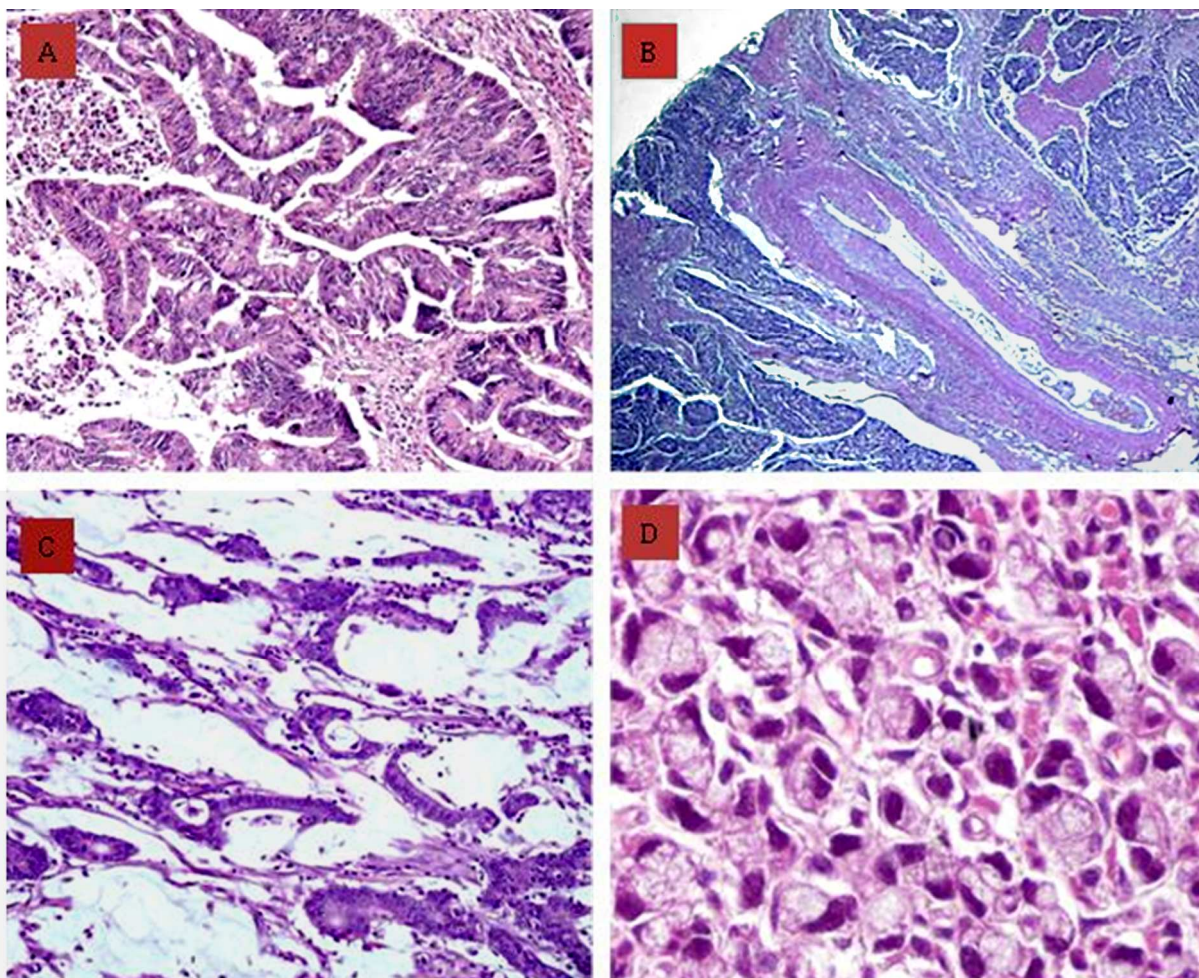
Las secciones histológicas se revisaron en un Microscopio Olympus BX 51. Asimismo, se compararon los resultados de las características anatomopatológicas de pacientes mayores y menores de 50 años, para identificar posibles diferencias en la presentación de CCR entre ambos grupos.

### **Selección de Material para Técnica Inmunohistoquímica y PCR en Pacientes Menores de 50 Años**

En los 106 casos de CCR de pacientes menores de 50 años se realizó una reevaluación en la que los criterios de selección incluía la presencia de tumor en más del 50% de la sección histológica, con el objetivo de realizar estudios de inmunohistoquímica; además, las secciones histológicas del tumor deberían estar libres de necrosis tumoral, defectos de fijación, y autólisis, ya que estos eventos dificultan la realización de la inmunohistoquímica y la extracción de una buena calidad de ADN para los estudios de PCR.

De los 106 casos, solo en 49 de ellos se encontraron secciones que cumplieran con los requisitos para el estudio de PCR. Aunque en todos los casos se contaba con material adecuado para estudios de inmunohistoquímica, el material para la detección de mutaciones de BRAFv600E fue subóptimo por la presencia de focos de necrosis y autólisis moderada, o la presencia de un componente predominante mucinoso, lo cual podría interferir con la recuperación de una cantidad adecuada y de calidad del ADN para los estudios de PCR (Fig. 16).

La razón por la cual los especímenes muestran estos cambios es debida a que recibimos material procesado en laboratorios de patología de otros hospitales y, en ocasiones, tienen problemas con la fijación y manejo del espécimen.



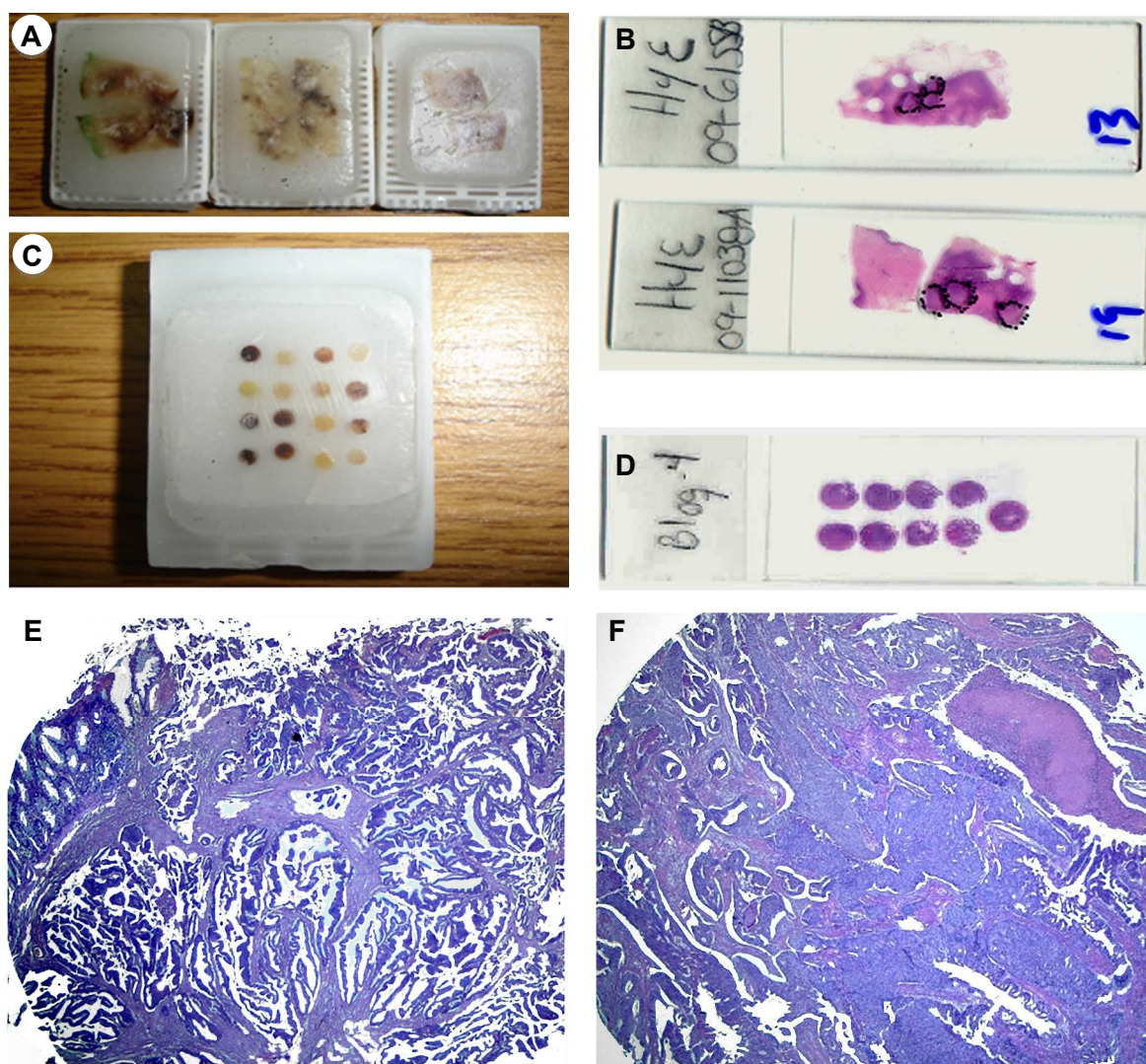
**Figura 16.** Secciones histológicas que muestran las características del material revisado para proceso de inmunohistoquímica y PCR. A: adenocarcinoma de variedad intestinal; B: adenocarcinoma medular. C: adenocarcinoma mucinoso puro (se eliminó por ausencia de material neoplásico glandular; insuficiente para estudio de PCR); D: adenocarcinoma con células en anillo de sello sólido.

## Construcción de Histomatrices de Pacientes Mayores de 50 Años

Se incluyeron además 48 casos de CCR en pacientes mayores de 50 años para estudios de inmunohistoquímica para proteínas de reparación del ADN (MLH1, MSH2), para los cuales se construyeron histomatrices: se evaluaron las secciones teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E) de todos los casos y se seleccionaron las áreas mejor conservadas del tumor y de cada uno se obtuvieron dos sacabocados de 5 mm de diámetro, que posteriormente fueron incluidos en un bloque de parafina.

Cada bloque de parafina contenía cuatro casos diferentes con dos sacabocados, con un tejido control que servía tanto de referencia como de tinción (Figura 17).





**Figura 17.** Construcción de histomatrices de pacientes mayores de 50 años. A: bloques donadores con CCR's; B: secciones de H&E para evaluación de tumores con células neoplásicas viables en el 50% del cilindro; C: bloque de parafina con cilindros de 5 mm con CCR; D: portaobjetos con histomatrices, secciones de 5 µm teñidas con H&E; E y F: secciones histológicas para revaloración de material óptimo para estudio de inmunohistoquímica y PCR.

## Selección de Material para Extracción de ADN y PCR

De los bloques de parafina de los CCRs se revisaron las secciones con tumor teñidas con H&E, considerándose como óptimo para extracción sólo aquellos casos con tumor viable en más del 50% de la sección revisada (al menos 3 mm de tumor) con ausencia de autólisis, alteraciones en la fijación y tumores mucinosos puros, debido a la dificultad que presenta la mucina para recuperar una buena cantidad de núcleos neoplásicos para la extracción de ADN.

Se puncionaron, con una aguja sacabocados de 5 mm, dos cilindros de cada bloque de parafina, y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, con identificación del número quirúrgico e iniciales del paciente, para la extracción de ADN y, posteriormente, PCR.

## **Reactivos Utilizados**

### **Ensayos de PCR**

- Reactivo TRI<sup>®</sup> REAGENT, cloroformo, isopropanol y DEPC (Dietilenpirocarbonato) de Sigma (St. Louis, MO, EEUU) y etanol de Panreac.
- dNTPs, oligoDTs, DTT de Invitrogen (Canada), RNasin de Promega (Madison, WI, EEUU).
- DNA polimerasa de Biotools (Barcelona, España) y oligonucleótidos específicos de TIB MOLBIOL (Berlín, Alemania).
- Marcadores de pares de bases de ADN de Biotools, agarosa de Bioron (Ludwigshafen, Alemania) y bromuro de etidio de Sigma.
- QIAquick gel extraction kit de Quiagen (Hilden, Alemania).
- Kit de PCR cuantitativa a tiempo real de Applied Biosystem (Foster City, CA, EEUU).

### **Detección de Proteínas en Ensayos de Inmunohistoquímica**

- Anticuerpos monoclonales de ratón anti-MLH1 y MSH2
- Sistema de detección Flex Dako (polímero)

### **Soluciones y Tampones Generales**

- Ácido acético, acetato sódico, citrato trisódico, ácido cítrico, etanol, metanol, isopropanol, butanol, HCl, NaCl, NaF, NaOH, sacarosa, TCA, Tris, glicina, formaldehído y TEA de Panreac.
- Aprotinina, azul de bromofenol, rojo Ponceau, bacitracina, DMSO (dimetil sulfoxido), glicerol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, leupeptina, β-mercaptoetanol, xileno, cianol FF, NP-40, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, pepstatina, PMSF, Triton X-100 y Tween-20 de Sigma.
- MgCl<sub>2</sub>, KCl, DTT, EDTA, SDS, de Merck.

## MÉTODOS

### Técnica Histológica para Muestras Incluidas en Parafina

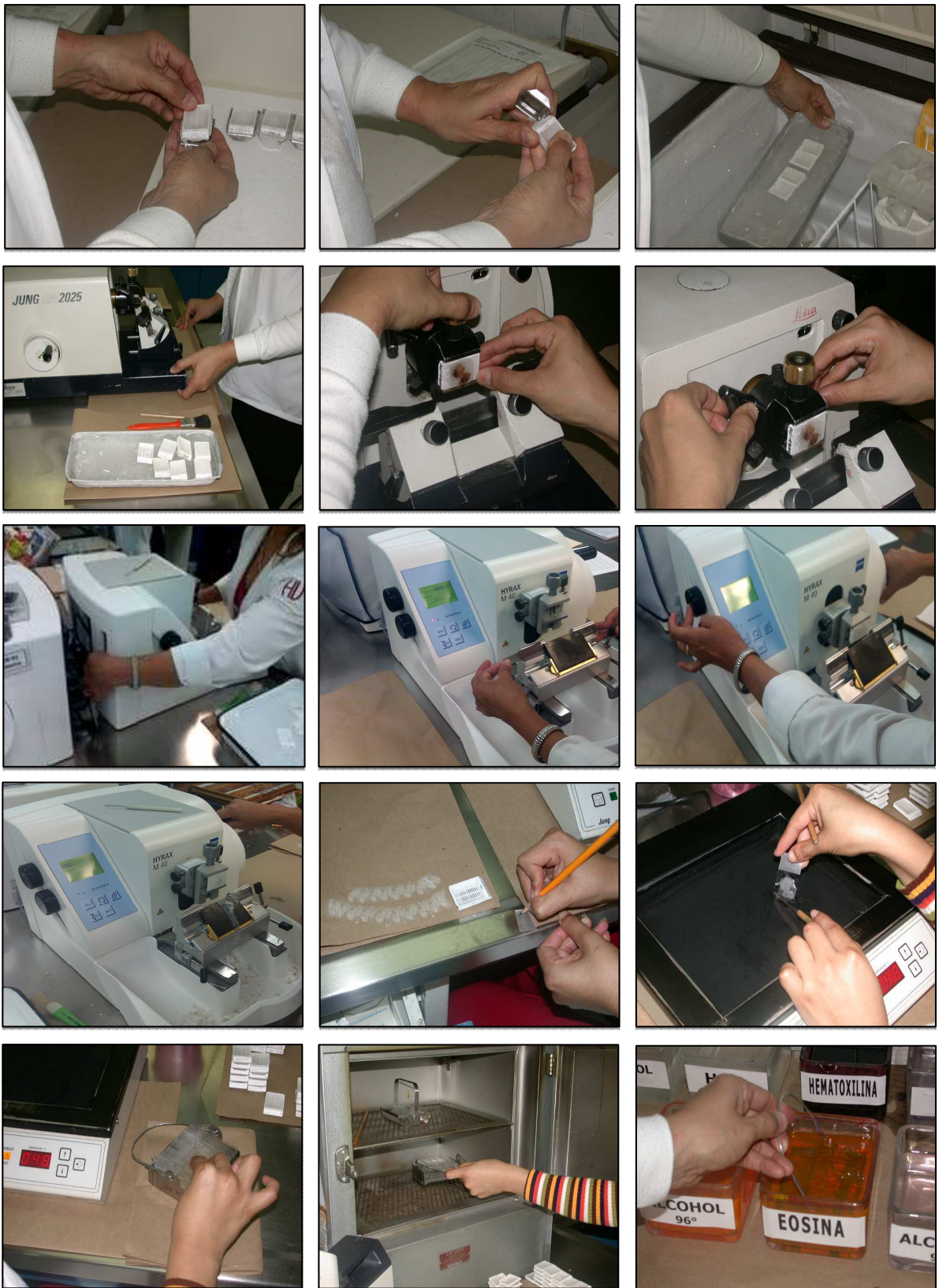
Los bloques de parafina se colectaron de especímenes resecados por CCR en el hospital universitario y de casos enviados a revisión al servicio para tratamiento oncológico, en forma prospectiva y retrospectiva. En todos los casos se revisó la disponibilidad de secciones y bloques para su evaluación, con motivo de este estudio se realizaron nuevos juegos de secciones de los bloques de parafina de los pacientes seleccionados. En la Figura 18 se ilustra el procedimiento.

#### Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E)

1. Se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor con un microtomo MICROM HM 330 de Zeiss.
2. Adhesión de los cortes en baño de flotación (Leica 1600), a los portaobjetos recubiertos con 3-aminopropyl-triethoxysilane (TESPA) al 1% en acetona.
3. Desparafinar e hidratar mediante pasos por alcoholes de concentraciones crecientes.
4. Teñir con hematoxilina de Carazzi durante 5 min.
5. Lavado en agua corriente durante 15 min.
6. Teñir en una solución de eosina durante 30 seg.
7. Lavado en agua.
8. Deshidratar en alcoholes de concentraciones crecientes
9. Montar con resina sintética o Entellán®.

Los resultados que se obtienen son: los núcleos en color violeta, y el colágeno y el tejido conectivo aparecen teñidos de color rosa.





**Figura 18.** Procedimiento de técnica histológica de bloques de parafina y secciones teñidas con H&E.

## Técnica de Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó en el laboratorio de Inmunohistoquímica del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario Dr. Jose E. González. Los tejidos seleccionados se fijaron en formaldehído diluido en tampón fosfato y el pH de la solución fue de 7.

1. Se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor con el microtomo.
2. Se pegaron los cortes a los portaobjetos recubiertos con TESPA.
3. Se dejó secar toda la noche a 37 °C.
4. Los cortes se dejaron 30 min. en la estufa a 60 °C antes de desparafinar las muestras.
5. Se desparafinó y se hidrató el tejido:
 

▪ Xileno I	15 min
▪ Xileno II	15 min
▪ Alcohol 100 <sup>0</sup> I	10 min
▪ Alcohol 100 <sup>0</sup> II	10 min
▪ Alcohol 96 <sup>0</sup>	5 min
▪ Alcohol 70 <sup>0</sup>	5 min
▪ Agua destilada	5 min
- 6.- Bloqueo de la peroxidasa endógena mediante la incubación de las secciones desparafinadas e hidratadas con 0.3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua, durante 20 min. a temperatura ambiente.
- 7.- Lavado en tampón tris salino (TBS)-Tween a pH 7.4 durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Colocar los portaobjetos en un rack de plástico, y sumergir el rack en tampón citrato 0.01M a pH 6.0 en una olla de presión calibrada para temperatura controlada (Pascal DAKO), ejerciendo una temperatura de 95 °C durante 15 min.
9. Dejar enfriar los cortes dentro de la olla sin destapar durante 20 min.
10. Lavar las muestras dos veces durante 5 min. cada una en TBS-Tween.
11. Bloquear la unión no específica incubando las secciones en TBS que contiene 3% de suero de burro (NDS) y 0.05% de Tritón X-100 durante 30 min.

12. Eliminar el sobrenadante del suero y sin lavar, añadir los anticuerpos monoclonales de ratón para MLH-1 y MSH-2 diluidos previamente 1:25 con diluyente de anticuerpo DAKO pH 7 (Biocare Medical, Concord CA), se incubaron con el anticuerpo primario por 60 minutos, para después lavarse en dos cambios de solución Tween por 10 minutos cada uno.
13. Lavado como en el paso 10.
14. Incubar las secciones con el anticuerpo secundario biotinilado (LSAB-kit, Dako) durante 20 min.
15. Lavado como en el paso 10.
16. Incubar las secciones con el sistema de detección Flex Dako (polímero) durante 20 min.
17. Lavado como en el paso 10.
18. Revelar usando diamino-benzidina. Comprobar la tinción con el microscopio y detener la reacción cuando se obtenga una señal fuerte.
20. Lavado en agua.
21. Contrastar con Hematoxilina de Harris.
22. Lavado en agua
23. Deshidratación durante 5 minutos en los siguientes alcoholes: 70<sup>o</sup>, 96<sup>o</sup>, 100<sup>o</sup> y Xileno.
24. Montar los cubres sobre los portas con Entellán.

En la Figura 19 se muestran las distintas etapas de la técnica de inmunohistoquímica.

### **Interpretación de la Inmunorreacción y Controles**

La interpretación se llevó a cabo bajo microscopio Olympus BX51, a 10 y 20 aumentos siguiendo las recomendaciones del UKNEQAS.

Se consideró como positiva la reacción del anticuerpo primario, MLH1 o MSH, cuando se encontró positividad nuclear en el tejido control interno: linfocitos, células estromales fibroblásticas o criptas colónicas normales sin displasia o cambios adenomatosos; asimismo, en el caso de la positividad en las criptas colónicas, la tinción nuclear debería ser fuertemente positiva en la base de las criptas normales y tenue en la región apical. En la evaluación de los tumores se consideró como una tinción óptima cuando se observó tinción nuclear en, al menos, el 50% de las células neoplásicas.





**Figura 19.** Técnica manual de inmunohistoquímica para procedimiento de detección de proteínas de la reparación, MLH1 y MSH2.

Este criterio es fundamental pues, se interpretó como pérdida de la reparación, o tumor con IMS, cuando las células neoplásicas resultaron negativas para cualquiera de los anticuerpos MLH1 y MSH2. El objetivo es evitar la posibilidad de falsos negativos, pues el resultado de negatividad para cualquiera de los dos marcadores se clasificó como un tumor con alteración en la reparación del ADN.

## Procesamiento de Muestras para PCR

### Aclaramiento del Tejido

Antes de llevar a cabo la extracción del ADN, las muestras se trataron para eliminar la parafina, en forma manual.

1. Se desparafinaron las muestras (dos veces) en 1 ml de xilol durante 15 minutos cada vez.
2. Se centrifugaron a 12000 g, 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó 1ml de etanol al 100%, se agitó manualmente, se esperó 30 minutos.
3. Se centrifugó y descartó el sobrenadante para obtener una solución para extracción de ADN.

### Extracción de ADN

La extracción del ADN total se realizó mediante el método fenol-cloroformo. La digestión fue realizada con proteinasa K. Para el proceso de extracción del ADN, se agregó 1ml de etanol al 70%, y 1ml de PBS (dos veces). Se agregó 500 µl de tampón de lisis (50 µl Proteinasa K 20mg/ml; 10 µl Tris-HCl 1M; 2 µl EDTA 0,5M; 100 µl SDS 10% y 838 µl agua destilada) y se incubó toda la noche a 52 °C en agitación continua. Se agregó 500µl de fenol:cloroformo:isomilalcohol (25:24:1), se agitó y se centrifugó por 5 minutos.

El sobrenadante se descartó a otro microtubo, se agregó 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M al precipitado y se agitó manualmente. Se adicionó un volumen de isopropanol y se almacenó toda la noche a -20°C. Se centrifugó, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó una vez con 1 ml de etanol 70%, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El ADN seco, se disolvió en 50µl de agua bidestilada estéril y se almacenó a -20°C. Además, se realizó la extracción de ADN de la línea celular HT29 (línea tumoral humana derivada de adenocarcinoma de colon, la cual presenta la mutación BRAFv600E en forma heterocigota) para ser usado como control positivo en nuestro estudio.

Se analizó la cantidad y la calidad del ADN obtenido midiendo la absorción de luz a dos longitudes de onda (260 nm/280 nm), con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Para ver el grado de pureza, se calcula la relación Abs 260/Abs 280, siendo en todos los casos aproximadamente de 2. Posteriormente se almacenaron las muestras a -20° C para su posterior estudio.

## Detección de la Mutación BRAFv600E

La selección de tejido se basó en el examen al microscopio de secciones teñidas con hematoxilina y eosina para estimar el área de tejido tumoral y posteriormente realizar un sacabocado de dicha área y ser recolectado en tubos Eppendorf de 1.5 ml para la posterior extracción del ADN.

Para la detección de la mutación BRAF V600E, se utilizó el método de PCR en tiempo real. Se eligieron iniciadores y sondas Taqman (Applied Biosystems) previamente validados en un estudio realizado en población española.<sup>17</sup>

### PCR en Tiempo Real

Los cebadores utilizados fueron diseñados para alinearse dentro de intrones para evitar la amplificación de un pseudogen ubicado en el cromosoma X generando un amplicón de 125 pb. Los fluoróforos reporteros utilizados para las sondas fueron VIC (Applied Biosystems), para la detección del alelo en forma silvestre y FAM para la detección del alelo mutante.

Como control positivo se utilizó ADN extraído de la línea celular HT29 (línea tumoral humana derivada de adenocarcinoma de colon), la cual presenta la mutación BRAFv600E en forma heterocigota. Las secuencias de los cebadores y las sondas utilizadas se reflejan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Secuencias de los cebadores y las sondas para PCR.

	Iniciadores	Producto (pb)
<b>Sentido</b>	5'-CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA-3'	125
<b>Antisentido</b>	5'-ATCCAGACAACTGTTCAAAGTGATG-3'	
	Sondas	
<b>Mutante</b>	5'-FAM-TAGCTACAGAGAAATC-3'	
<b>Wild type</b>	5'-VIC-CTAGCTACAGTGAAATC-3'	

Para la estandarización de la PCR en tiempo real, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 20 µl, conteniendo 10 µl de 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 900 nmol/l de cada primer, 250 nmol/l de cada sonda, utilizando

diferentes concentraciones de ADN (10 ng, 20 ng, 100 ng y 1000 ng) en 5 µl, obteniendo una amplificación en un ciclo más temprano con la concentración de 20 ng de ADN.

La PCR se realizó en tubos MicroAmp Optical de 0.2 mL (Applied Biosystems), la amplificación y detección de fluorescencia se realizó con el ABI prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron las siguientes:

- 2 minutos a 50 °C.
- 10 minutos a 95 °C.
- 50 ciclos de 15 segundos a 92 °C.
- 1.5 minutos a 60 °C.

Los resultados fueron analizados con el software del ABI prism 7000, obteniendo los gráficos de amplificación.

Para validar nuestro estudio se utilizó la línea celular HT29, que presenta la mutación BRAFv600E de forma heterocigota, y en los gráficos de amplificación, se observó amplificación de ambas sondas, la forma nativa y la mutada, lo que demuestra el correcto alineamiento, amplificación y fluorescencia de primers y sondas. Al analizar el resultado obtenido con la PCR en tiempo real, sólo la sonda dirigida al alelo silvestre mostró amplificación en todas las muestras, no así para la sonda dirigida al alelo mutante, la cual mostró amplificación sólo en la línea celular HT29, en forma heterocigota (Tabla 6).

**Tabla 6.** Correlación sonda/secuencia en las sondas Taqman utilizadas en la PCR.

Fluorescencia detectada	Indicativa de ....
VIC	Homocigoto para el alelo X125
FAM	Homocigoto para el alelo Y
Ambas	Heterocigoto

## Análisis de Inestabilidad Microsatelital

A los pacientes que presentaron alteraciones en la expresión de alguna de las proteínas MSH2 o MLH1 se les investigó la inestabilidad microsatelital mediante secuenciación.

Para el análisis de la IMS se estandarizó el Kit MSI Analysis System versión 1.2 de Promega Corporation, utilizando el DNA anteriormente extraído de tejido tumoral y tejido sano. El análisis de IMS incluyó iniciadores con marcaje fluorescente para la amplificación de un panel de 7 marcadores previamente validados, 5 marcadores mononucleótidos para determinar la presencia de IMS y 2 marcadores pentanucleótidos como marcadores internos, para asegurar que el tejido tumoral y sano correspondieran a la misma muestra (Tabla 7).

**Tabla 7.** Secuencias de los marcadores para el análisis de inestabilidad microsatelital.

Marcador	# GenBank	Secuencia repetitiva	Rango de amplicón (bp)	Fluorocromo de iniciador
NR-21	XM_033393	(A) <sub>21</sub>	94-101	JOE
BAT-26	U41210	(A) <sub>26</sub>	103-115	FL
BAT-25	L04143	(A) <sub>25</sub>	114-124	JOE
NR-24	X60152	(A) <sub>24</sub>	130-133	TMR
MONO-27	AC007684	(A) <sub>27</sub>	142-154	JOE
PENTA-C	AL138752	(AAAAG) <sub>3-15</sub>	143-194	TMR
PENTA-D	AC000014	(AAAAG) <sub>2-17</sub>	135-201	FL

La amplificación de los marcadores se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 8 µl, conteniendo 5.85 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de Gold STAR 10X Buffer, 1 µl de MSI Analysis System 10X Primer Pair Mix y 0.15 µl de AmpliTaq Gold DNA Polimerasa, reflejado en la tabla siguiente.

**Tabla 8.** Mezcla para la amplificación de los marcadores de inestabilidad microsatelital.

Componente	Volumen
Agua libre de nucleasas	5.85 $\mu$ l
Gold STAR 10X Buffer	1.00 $\mu$ l
Primers mix	1.00 $\mu$ l
AmpliTaq Gold polimerasa	0.15 $\mu$ l
DNA	200 ng
Volumen total	10 $\mu$ l

**Tabla 9.** Condiciones de amplificación de los marcadores de inestabilidad microsatelital.

Temperatura	Tiempo	
95 °C	11 minutos	
96 °C	1 minuto	
94 °C	30 segundos	} 10 ciclos
58 °C	30 segundos	
70 °C	1 minuto	
90 °C	30 segundos	} 20 ciclos
58 °C	30 segundos	
70 °C	1 minuto	
60 °C	30 minutos	
4 °C		

Los productos de las amplificaciones fueron detectados mediante electroforesis capilar utilizando el secuenciador ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se utilizó el marcador Liz 500 como marcador interno, para ajustar las variaciones entre ensayos.

La detección de IMS, se basó en la comparación de los perfiles alélicos generados por la amplificación del ADN de tejido tumoral y sano correspondientes a la misma muestra, donde la aparición de un alelo novel en el ADN tumoral para cualquiera de los 5 marcadores del panel de IMS indicaba inestabilidad para dicho marcador.

Los resultados fueron analizados según las recomendaciones de los criterios de Bethesda, los que señalan que la presencia de 2 o más marcadores con inestabilidad son indicativos de IMS-alta, 1 marcador es indicativo de IMS-baja y 0 marcadores estabilidad microsatelital.

## **Detección de Deleciones o Duplicaciones en los Genes de la Reparación MLH1 y MSH2**

### **Técnica de MLPA (Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification)**

#### **Desnaturalización del ADN e Hibridación de las Sondas**

- Se diluyó la muestra de DNA (20-500 ng DNA) con TE a 5 µL.
- Se calentó 5 minutos a 98°C.
- Se enfrió a 25°C antes de abrir el termociclador.
- Se agregó: 1,5 µl del mix con las sondas + 1,5 µl de MLPA buffer y se mezcló.
- Se incubó la mezcla 1 minuto a 95°C.
- Posteriormente, se incubó 16 horas a 60°C.

#### **Reacción de Ligación**

- Se redujo la temperatura del termociclador a 54°C.
- Manteniendo la temperatura a 54°C, se añadieron 32 µl de la solución de ligasa a cada muestra y se mezcló.
- Se Incubó 15 minutos a 54°C.
- Se calentó 5 minutos a 98°C.
- Se continuó con los pasos de PCR (Tabla 10).

**Tabla 10.** Resumen de la técnica de MLPA (Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification).

Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización del ADN</b>	
98 °C	5 minutos
25 °C	Añadir la mezcla de hibridación
<b>Reacción de hibridación</b>	
95 °C	1 minuto
60 °C	20 horas
<b>Reacción de ligación</b>	
54 °C	Añadir la mezcla con ligasa
54 °C	15 minutos
98 °C	5 minutos
15 °C	Añadir la mezcla con el tampón de PCR
<b>PCR</b>	
60 °C	Añadir la mezcla con polimerasa
95 °C	30 segundos
60 °C	30 segundos
72 °C	60 segundos
72 °C	20 minutos
15 °C	

} 35 ciclos

## Análisis Estadístico

Se utilizó para el análisis estadístico el software SPSS 10 y Epidat 3.1. Para las características histopatológicas generales, se realizaron análisis con t de Student para la diferencia de medias, y prueba chi-cuadrado para diferencia de proporciones.

Para la relación entre edad y expresión de las proteínas asociadas a reparación, se realizó un análisis de correlación de Pearson. Para determinar si existe asociación entre la edad y la pérdida de expresión de las proteínas, se realizó un análisis de regresión logística.



## RESULTADOS

## Características Clínicas

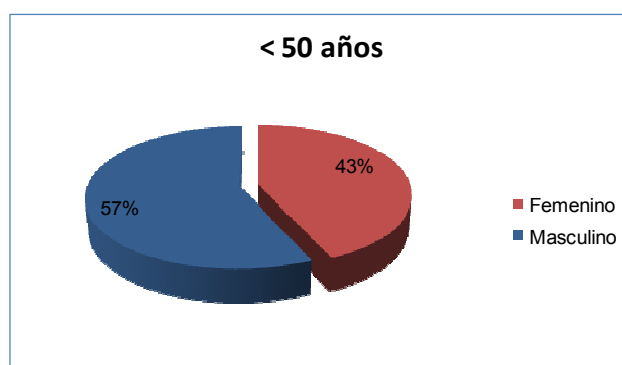
Se estudiaron 58 pacientes con cáncer colorrectal (CCR) menores de 50 años. En este grupo, 33 pacientes fueron hombres (56.9%), y 25, mujeres (43.1%); la edad promedio fue de 36.7 años. Se observó una discreta tendencia a la presencia de CCRs en hombres jóvenes en relación a las mujeres en este grupo. El paciente más joven detectado en esta serie de casos fue de 29 años (Tabla 11 y Figs. 20-22).

En el grupo de pacientes mayores de 50 años, se estudiaron 23 mujeres (47.9%) y 25 hombres (52.1%), la edad promedio de éstos fue de 64.7 años ( $\pm 9.5$  años). En este grupo, sin embargo, no se observó ninguna tendencia significativa en cuanto a presentación de CCR según el sexo (Tabla 11 y Figs. 20-22).

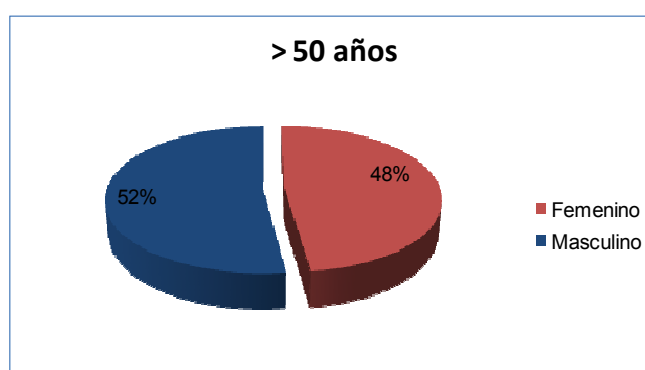
**TABLA 11.** Características generales del cáncer colorrectal en los pacientes del estudio, estratificadas por grupos de edad.

VARIABLES	Edad			
	< 50 años (n=58)	$\geq 50$ años (n=48)	Estadístico	p
<b>Edad en años (media <math>\pm</math> DS)</b>	36.7 $\pm$ 8.53	64.7 $\pm$ 9.5		
<b>Sexo</b>				
Femenino	25 (43.1%)	23 (47.9%)	0.246	0.62
Masculino	33 (56.9%)	25 (52.1%)		
<b>Localización del Tumor</b>				
Colon	28 (48.3%)	20 (41.6%)	0.46	0.56
Sigmoides	30 (51.7%)	28 (58.3%)		
<b>Diámetro Tumoral (cm)</b>	6 $\pm$ 3.3	5.7 $\pm$ 2.9	0.635	0.7
<b>Tamaño (cm)</b>				
0.1 a 2.49	7 (12.0%)	13 (27.1%)	7.76	0.021
2.5 a 5	24 (41.4%)	9 (18.7%)		
$\geq 5.1$	27 (46.5%)	26 (54.2%)		

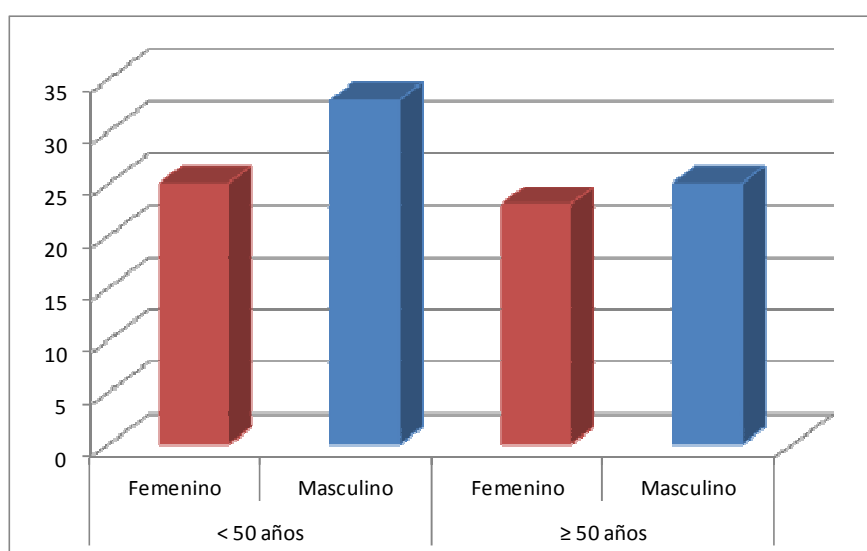
\* Prueba de t de Student para variables numéricas y  $X^2$



**Figura 20.** Distribución del cáncer colorrectal según el sexo en pacientes menores de 50 años.



**Figura 21.** Distribución del cáncer colorrectal según el sexo en pacientes mayores de 50 años.

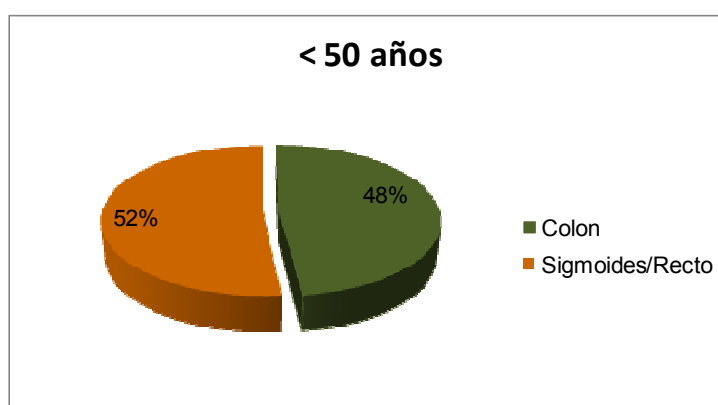


**Figura 22.** Distribución del cáncer colorrectal atendiendo al sexo y a la edad de los pacientes.

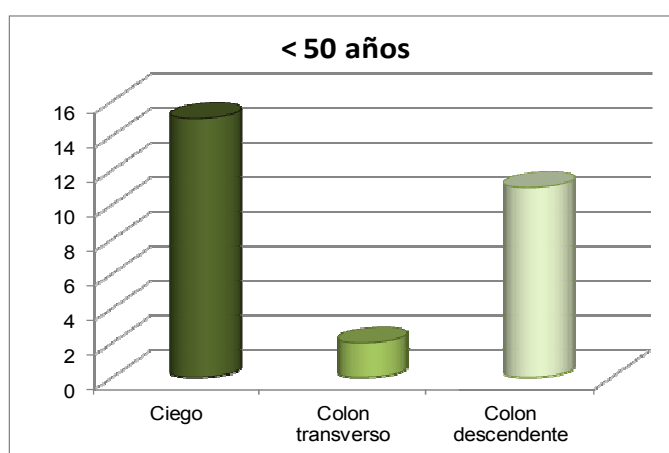
## Características Anatomopatológicas

### Localización del Tumor

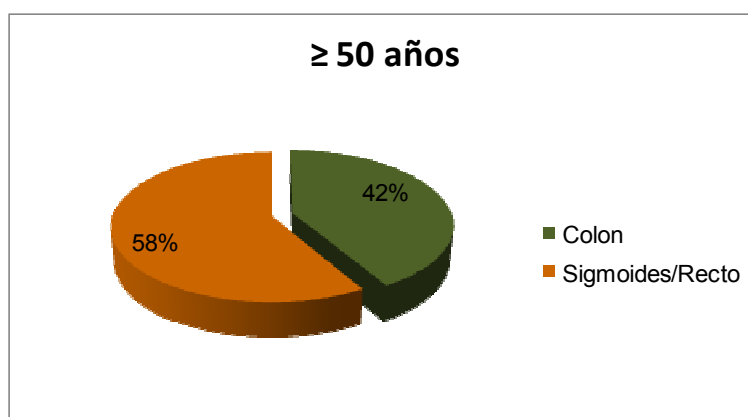
En los pacientes menores de 50 años, se identificaron 28 de ellos (48.3%) con CCR's en Colon; de éstos, 15 se localizaron en el ciego, 2 en el colon transverso y 11 en el colon descendente. En 30 casos (51.7%) la localización fue en el sigmoides y en el recto. Las localizaciones en los pacientes mayores de 50 años fueron: 20 (41.6%) en el colon descendente y 28 (58.3%) en el sigmoides y recto. Al comparar ambos grupos no se observó una diferencia significativa entre la localización entre pacientes jóvenes o adultos mayores ( $p=0.56$ ); sin embargo, existe una discreta tendencia a la presencia de tumores en colon derecho en pacientes jóvenes. Las variedades macroscópicas observadas fueron ulcerada, polipoide y sólida de aspecto mucinoso (Tabla 11 y Figs. 23-28).



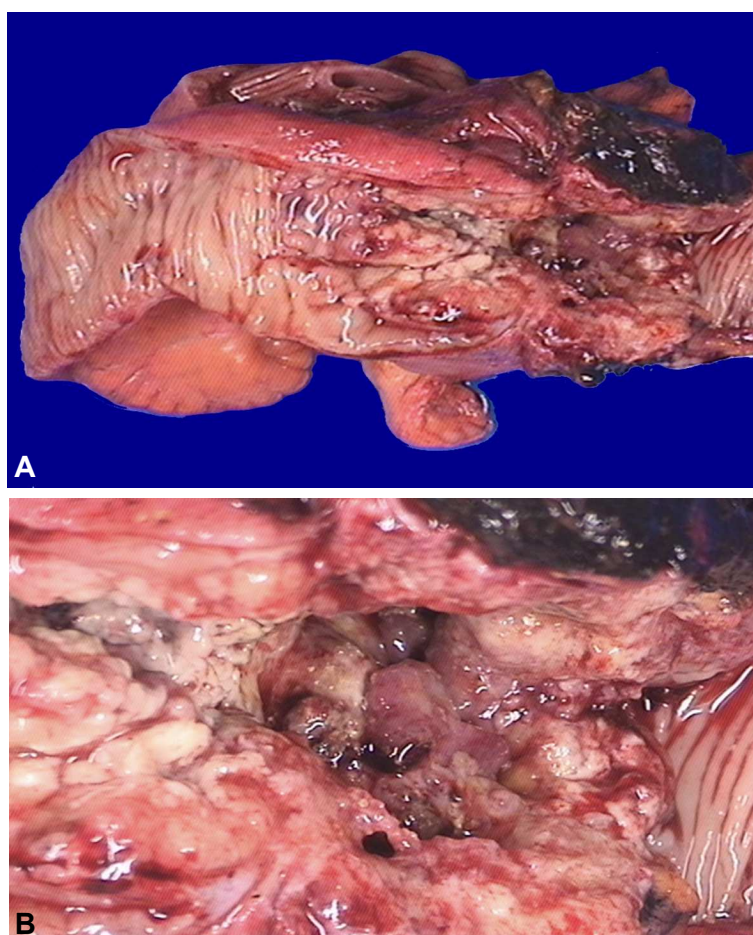
**Figura 23.** Localización del cáncer colorrectal en pacientes menores de 50 años.



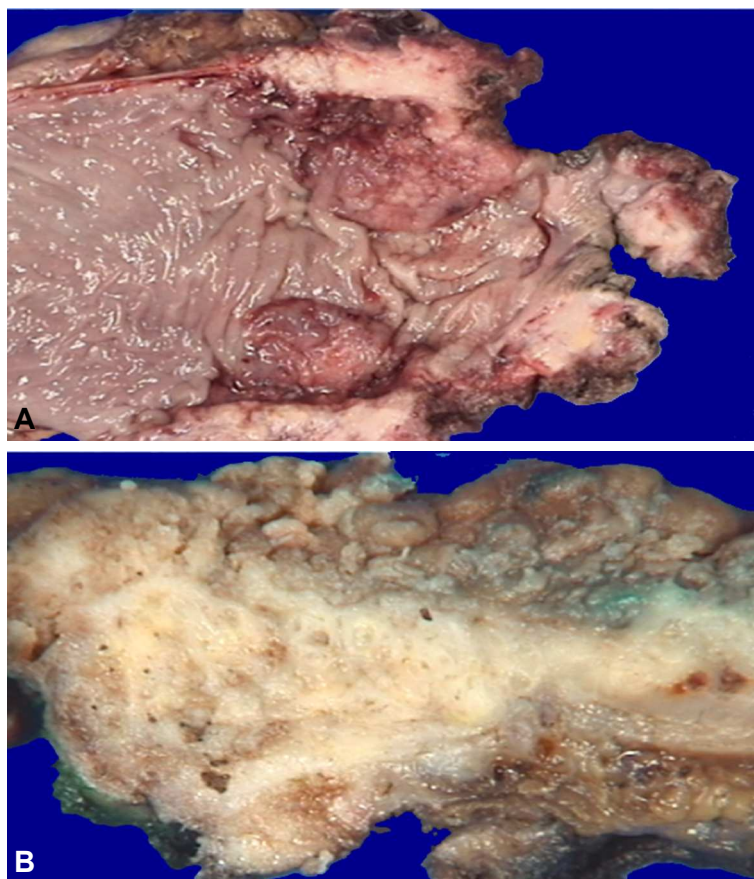
**Figura 24.** Distribución del cáncer colorrectal según su localización en el colon en pacientes menores de 50 años.



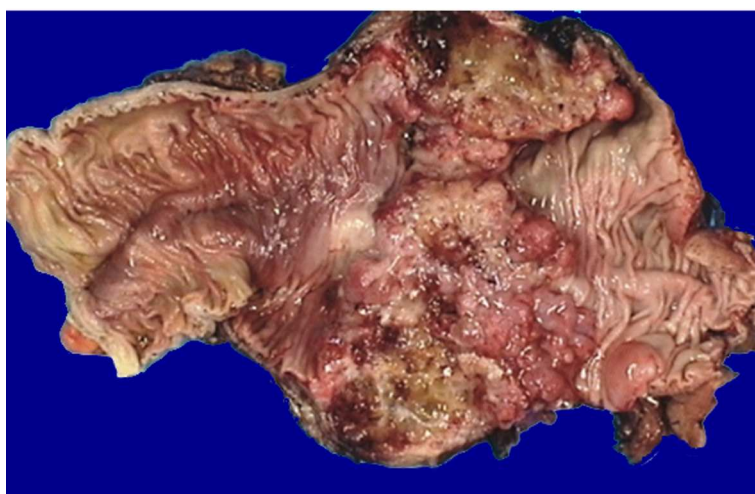
**Figura 25.** Localización del cáncer colorrectal en pacientes mayores de 50 años.



**Figura 26 A y B.** Segmento de ciego y colon ascendente. Se observa un tumor de 7 cm, localizado en el ciego, ulcerado y de bordes irregulares y mamelonados; macroscópicamente se aprecia luz estenosada con retracción de la serosa y disminución del calibre de la luz por la masa tumoral.



**Figura 27 A y B.** Resección por Carcinoma de Recto. Se observa una lesión de aspecto polipoide de crecimiento exofítico que involucra el recto y a todas las capas musculares y la serosa.



**Figura 28.** Segmento de Ciego. Tumor mamelonado con múltiples áreas quísticas amarillentas con moco en su interior.

## Tamaño Tumoral

El diámetro tumoral medio fue mayor de 5 cm para ambos grupos, menores y mayores de 50 años. Sin embargo, al analizar en subgrupos el tamaño, se observó que el 41.8% (24 de 58 casos) de los tumores en pacientes jóvenes medían entre 2.5 cm y 5 cm, mientras que en pacientes adultos mayores, el porcentaje fue del 18.7% (9 casos), con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.021$ ) (Tabla 11).

## Características Histopatológicas

El análisis histopatológico de los tumores reveló las siguientes variedades de adenocarcinoma: 1) intestinal, con 21 casos (36.2%) en menores de 50 años, y 34 (70.8%), en pacientes adultos mayores; 2) medular, con 13 casos (22.4%) en menores de 50 años, y 4 (8.3), en mayores de 50 años; 3) mucinoso, que se evidenció en 18 pacientes (31%) del grupo de jóvenes, y en 6 (12.5%), del grupo de mayores; y 4) en anillo de sello, observado en 4 casos (6.9%) de pacientes menores de 50 años, y en 2 (4.2%), de mayores de 50 años (Tabla 12).

### Adenocarcinoma Variedad Intestinal

La frecuencia del adenocarcinoma de variedad intestinal mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.008$ ) entre los pacientes jóvenes (36.2%) y los adultos mayores (70.8%) (Tabla 12).

Los tumores de tipo intestinal se caracterizaron histológicamente por una arquitectura de aspecto papilar en la superficie del tumor, con tallos fibroconectivos cubiertos por células cilíndricas, algunos con células caliciformes, como en el caso de los bien diferenciados, y con ausencia de ellas en los moderadamente diferenciados.

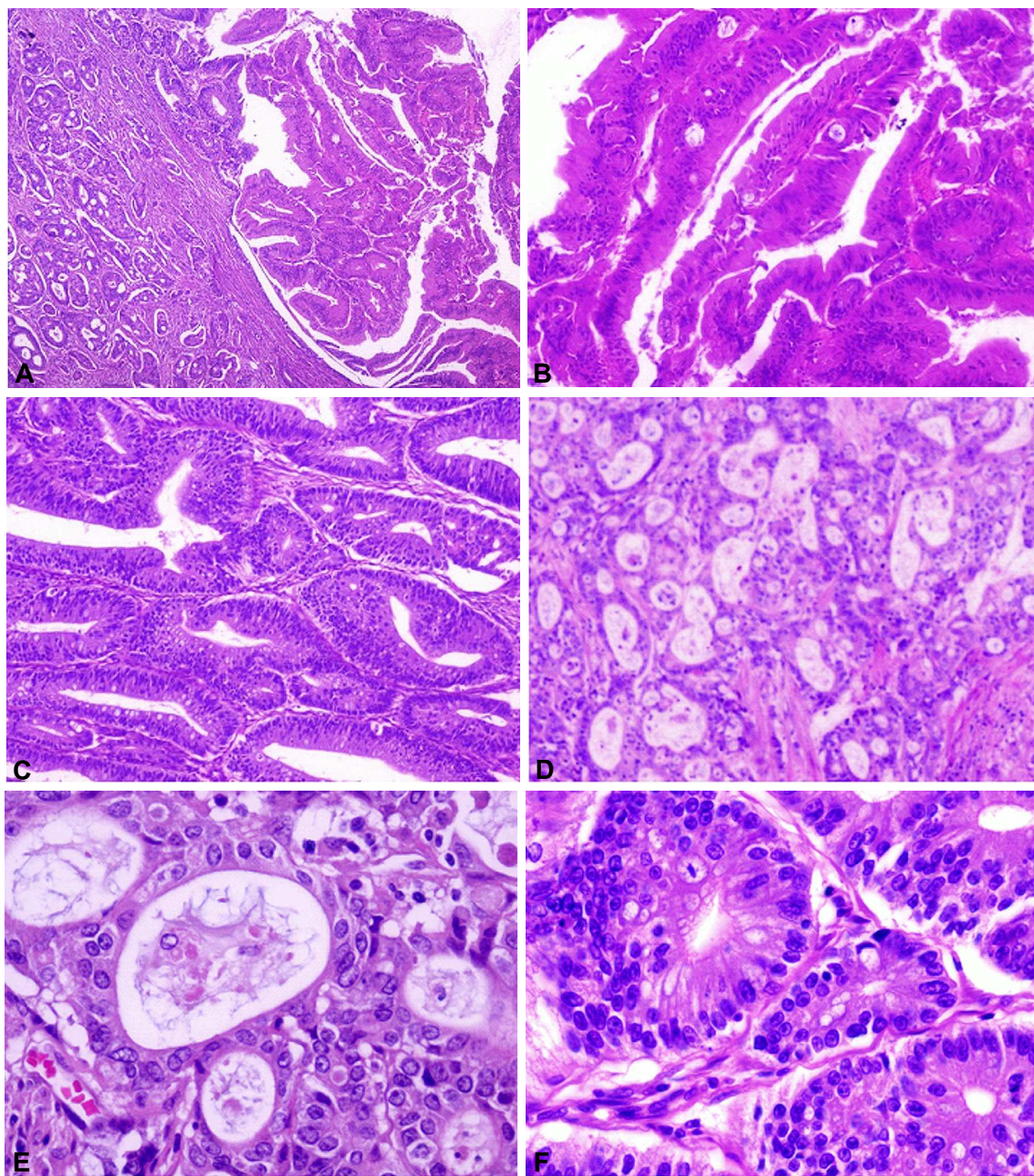
En el componente invasivo se observaron, con elevada frecuencia, formaciones glandulares tubulares revestidas con células cilíndricas bien definidas, de núcleos ovoides y pequeño nucléolo, algunas con citoplasma denso y otras con vacuolas con moco. Las características histopatológicas se ilustran en la figura 29.

**TABLA 12.** Características generales del cáncer colorrectal en los pacientes del estudio, estratificadas por grupos de edad.

VARIABLES	Edad			
	< 50 años (n=58)	≥ 50 años (n=48)	Estadístico	p
<b>Histopatología</b>				
Intestinal	21 (36.2%)	34 (70.8%)	13.68	0.008
Medular	13 (22.4%)	4 (8.3%)		
Mucinoso	18 (31.0%)	6 (12.5%)		
Anillo de Sello	4 (6.9%)	2 (4.2%)		
NOS	2 (3.0%)	2 (4.2%)		
<b>Infiltración</b>				
Muscular	13 (22.4%)	11 (22.9%)	2.107	0.551
Serosa	41 (70.7%)	33 (68.8%)		
Tg. Pericolónicos	1 (1.7%)	3 (6.25%)		
Vejiga y próstata.	3 (5.2%)	1 (2.1%)		
<b>Estadio Astler y Coller</b>				
B1	8 (13.8%)	6 (12.5%)	20.9	0.002
B2	18 (31%)	5 (10.4%)		
C1	3 (5.2%)	16 (33.3%)		
C2	23 (39.5%)	19 (39.6%)		
B3	4 (6.9%)	1 (2.1%)		
D1	2 (3.4%)	1 (2.1%)		
D				
<b>Ganglios positivos</b>				
0	26 (44.9%)	25 (52%)	4.20	0.379
1 a 3	15 (25.8%)	9 (18.7%)		
4 a 6	9 (15.5%)	3 (6.25%)		
7 a 10	5 (8.6%)	6 (12.5%)		
≥11	3 (5.2%)	5 (10.4%)		
<b>Adenoma</b>				
Adenomatoso	1 (4%)		28.4	0.001
Hiperplásico	1 (4%)			
Mixto				
Serrado	13 (52%)	1 (4%)		
Serrado plano	4 (16%)	3 (12%)		
Tubular	2 (8%)	2 (8%)		
Tubulovelloso	1 (4%)	1 (4%)		
Velloso	3 (12%)	18 (72%)		
<b>Pólipos</b>				
0		38 (97.4%)	75.126	0.000
1	3 (42.8%)			
2	2 (28.5%)			
3				
9	1 (14.3%)	1 (2.56%)		
>10	1 (14.3%)			

\* Prueba de t de Student para variables numéricas y  $\chi^2$



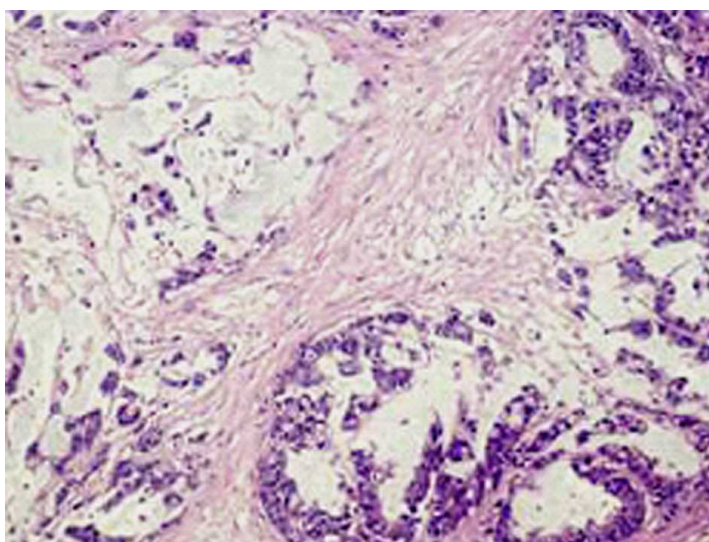


**Figura 29.** En la figura se ilustran las características histopatológicas de los tumores bien y moderadamente diferenciados variedad intestinal de CCR en pacientes jóvenes y adultos mayores. **A.** Adenocarcinoma con proyecciones papilares de aspecto intestinal asociados a formaciones glandulares 20X. **B.** Acercamiento a las formaciones papilares con celulares cilíndricas y caliciformes 40X. **C.** Estructuras glandulares neoplásicas distribuidas en forma compacta espalda con espalda y con epitelio cilíndrico mucoso secretor y con ausencia de maduración 20X. **D.** Formaciones neoplásicas glandulares con patrón cribiforme y espalda con espalda 20X. **E.** Formaciones glandulares neoplásicas con ausencia total de maduración y con núcleos irregulares con reforzamiento de la membrana nuclear y nucléolo patente, nótese además la formación de confluencia glandular y la formación de nidos sólidos 40X. **F.** Formaciones glandulares neoplásicas espalda con espalda con núcleos redondeados con atipia discreta y citoplasma con formación de moco en un adenocarcinoma bien diferenciado.

### Adenocarcinoma Variedad Mucinoso y en Anillo de Sello

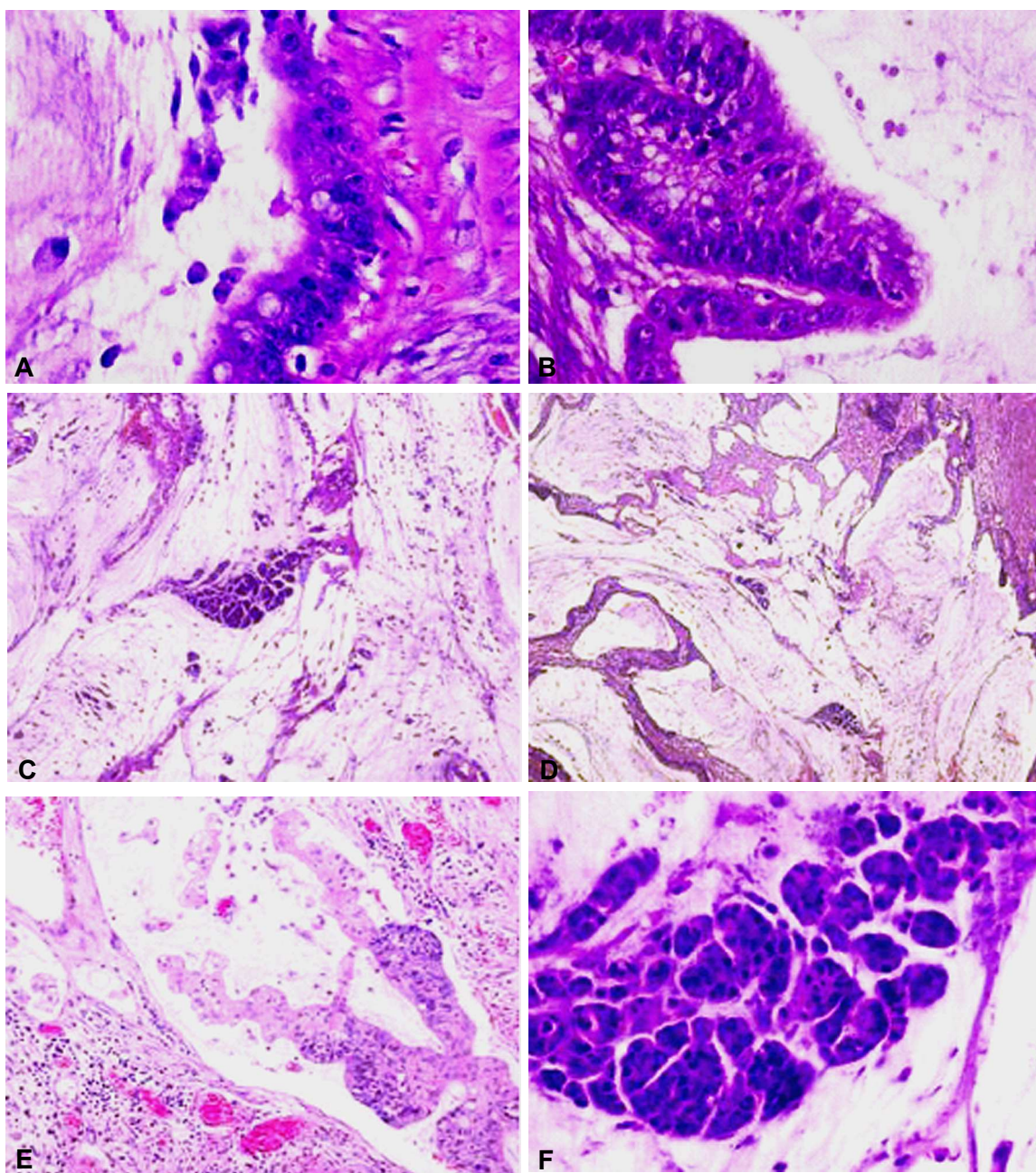
Las variedades mucinosa y anillo de sello fueron más frecuentes en pacientes jóvenes, 18 casos de mucinoso (31%) y 4 casos de anillo de sello (6.9%), en comparación con su frecuencia en adultos mayores, 6 casos mucinoso (12.5%) y 2 anillo de sello (4.2%). Se decidió agrupar estas dos variedades en un mismo grupo debido a que frecuentemente los componentes mucinoso y anillo de sello se encontraron combinados. La frecuencia de esta variedad mostró diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de edad ( $p=0.008$ ) (Tabla 12).

Estos tumores de variedad mucinosa se caracterizaron por una transición abrupta en su origen en la superficie de nidos sólidos y formaciones glandulares con células cilíndricas, con ausencia de maduración y citoplasma con escaso moco; sin embargo, los grupos celulares se desprendían de sus nidos y se observaban inmersos en grandes cantidades de moco. En ocasiones los espacios de moco se expandían y dejaban grandes espacios totalmente llenos de mucina, con escasas células inmersas en estas formaciones mucinosas, los núcleos de los nidos celulares eran hipercromáticos, con cromatina densa y con ausencia de nucléolo, alternando con citoplasmas densos y con producción de moco. Una característica adicional en algunos nidos es la observación de núcleos picnóticos que se desprenden de los nidos sólidos hacia la matriz mucinosa, motivo por el cual, algunos casos, fueron eliminados debido a la poca presencia de material celular y nuclear para la recuperación del ADN (Figs. 30-32).



**Figura 30.** Panorámica de tumor mucinoso con formaciones glandulares irregulares asociadas a nidos de células neoplásicas aisladas en un fondo mucoide. 10X.

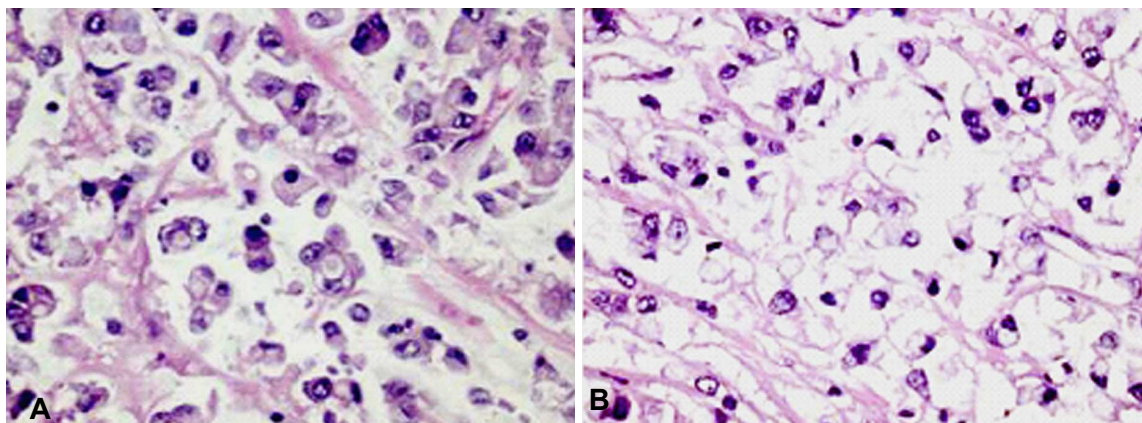




**Figura 31.** Adenocarcinoma poco diferenciado mucinoso. Esta variedad fue la más frecuente en pacientes jóvenes. **A, B.** Los tumores se caracterizaron por poseer formaciones glandulares parciales con epitelio cilíndrico y células mucoproducidas. 20X. **C-E.** A mediano aumento se observan abundantes lagos de moco asociados a escasas células y nidos neoplásicos, nótese el predominio de material mucoide. 10X. **F.** Nido sólido neoplásico compuesto por células redondeadas de núcleos hipercrómicos en un fondo mucoide. 40X.

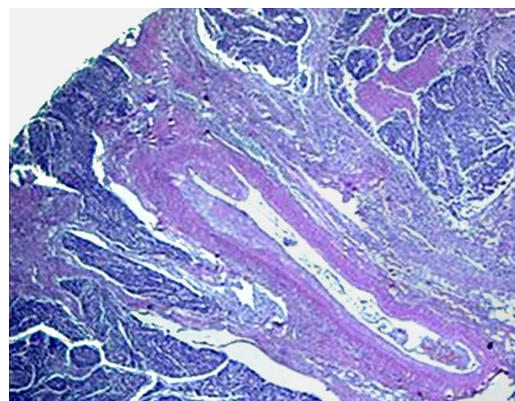
En los casos con células en anillo de sello, al menos, el 25% del tumor debería contar con este componente; las células, a diferencia de los mucinosos, no se agrupaban en nidos, se encontraban como células individuales infiltrando las capas musculares y la lámina propia de la muscular propia del colon. Los núcleos eran grandes, con membrana nuclear reforzada y, a

veces, con un pequeño nucléolo. La mayoría presentaban un citoplasma claro debido a la presencia de moco en su interior, desplazando a la periferia el núcleo e idéntandolo, confiriéndole así, apariencia de células en anillo de sello (Fig. 32).



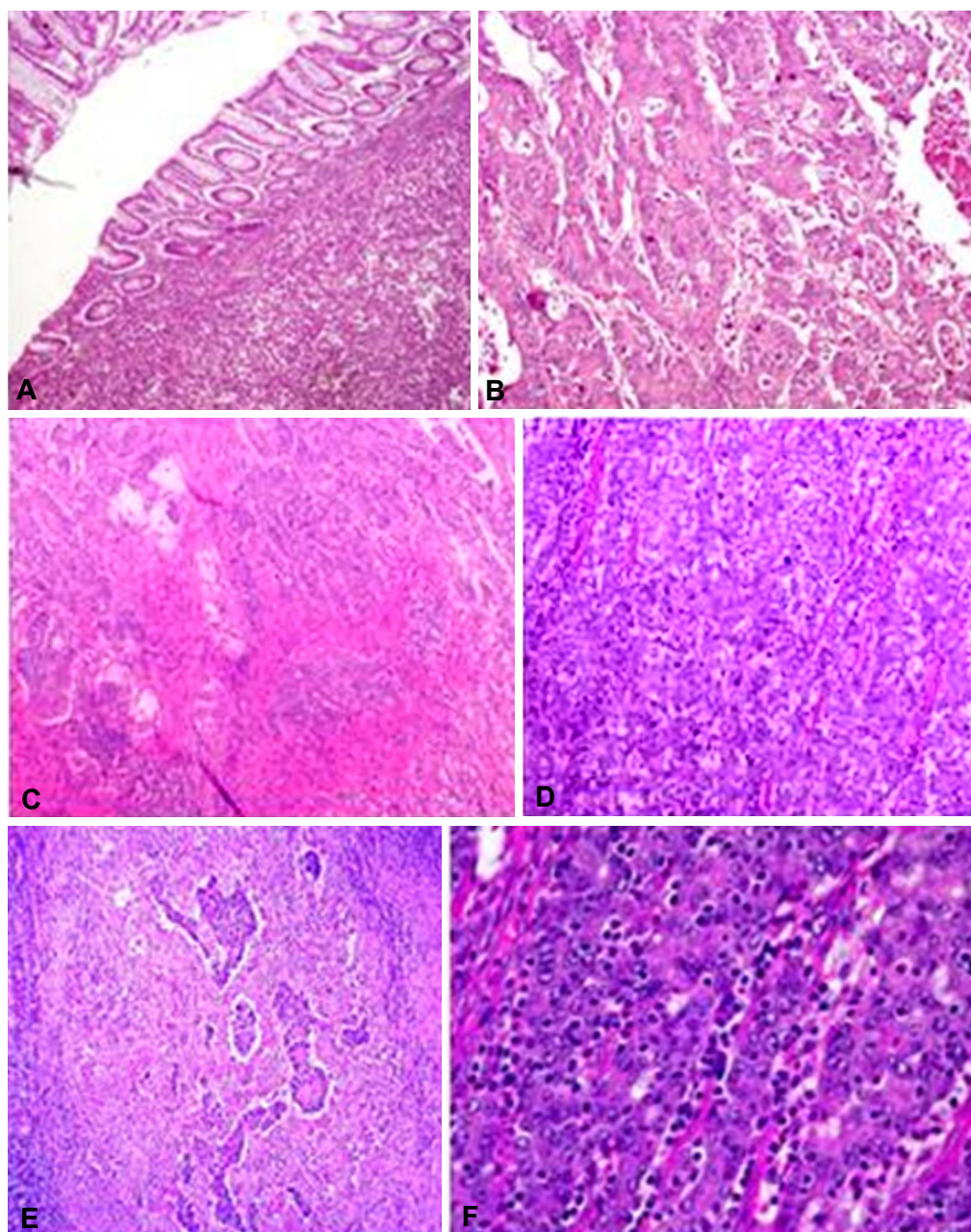
**Figura 32 A-B.** Adenocarcinoma poco diferenciado mucinoso. Algunos tumores de la variedad mucinosa presentaban células neoplásicas aisladas de núcleos redondeados con nucléolo y en el citoplasma una gran vacuola que desplazaba el núcleo a la periferia; en estos tumores cuando este patrón predomina se les denomina con células en anillo de sello 40X.

Según el tipo histológico, en los pacientes menores de 50 predominaron los tumores de tipo mucinoso, caracterizados por células aisladas con forma de anillo de sello combinadas con formaciones glandulares inmersas en lagos de moco. La segunda variedad más frecuente en los pacientes menores de 50 años fue la medular, caracterizada por nidos sólidos de células de núcleos grandes con nucléolo visible y citoplasma denso rodeadas por abundante infiltrado inflamatorio y linfocitos intratumorales, además de zonas con abundante infiltrado compuesto por macrófagos, células plasmáticas y necrosis (Figs. 33-35). Por el contrario, en los pacientes mayores de 50 años fueron más comunes los tumores de tipo intestinal, caracterizados por formaciones glandulares con células cilíndricas bien definidas de núcleos ovoides y pequeño nucléolo ( $p=0.0008$ ).

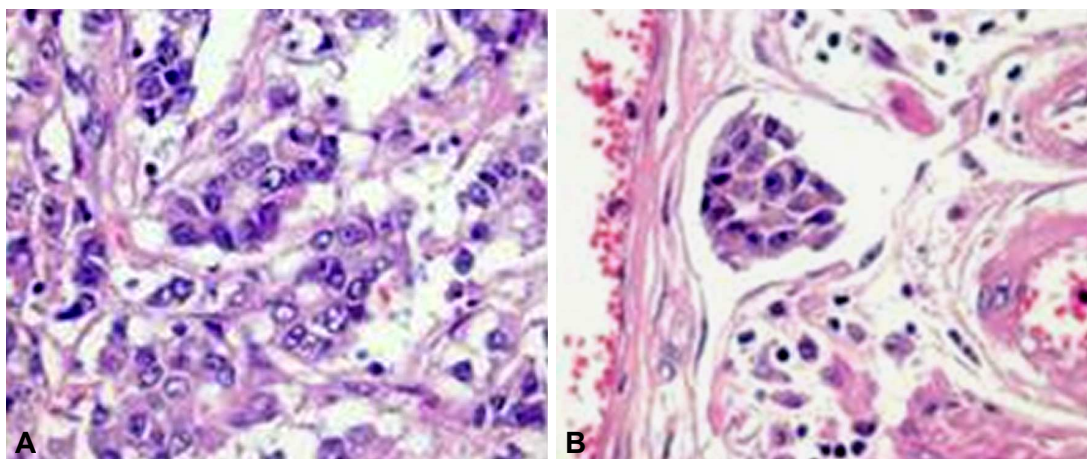


**Figura 33.** Carcinoma de variedad Medular. Se observa una neoplasia con un patrón en nidos sólidos neoplásicos. 10X.





**Figura 34.** Las fotomicrografías demuestran la presencia de un carcinoma variedad Medular. **A y B.** Se observa una neoplasia sólida sin transición con el epitelio normal y empujando la mucosa glandular normal. 20X. **C y D.** Escasas formaciones glandulares de células neoplásicas acompañadas de un patrón de crecimiento en nidos sólidos 20X. **E.** En algunos campos se observan además nidos sólidos de células neoplásicas asociadas a un infiltrado inflamatorio compuesto por macrófagos, células plasmáticas y linfocitos (similar al Crohn) 20X. **F.** Con mayor aumento se observan nidos sólidos de células neoplásicas con núcleos redondeados y nucléolo patente, asociados a un intenso infiltrado inflamatorio linfocítico. 40X.



**Figura 35.** Carcinoma de variedad Medular. **A.** A gran aumento, en algunas de las secciones del tumor se observan escasas formaciones glandulares con células de núcleos pleomórficos y nucléolo visible. 40X. **B.** Células neoplásicas en patrón sólido infiltrando linfáticos. 40X.

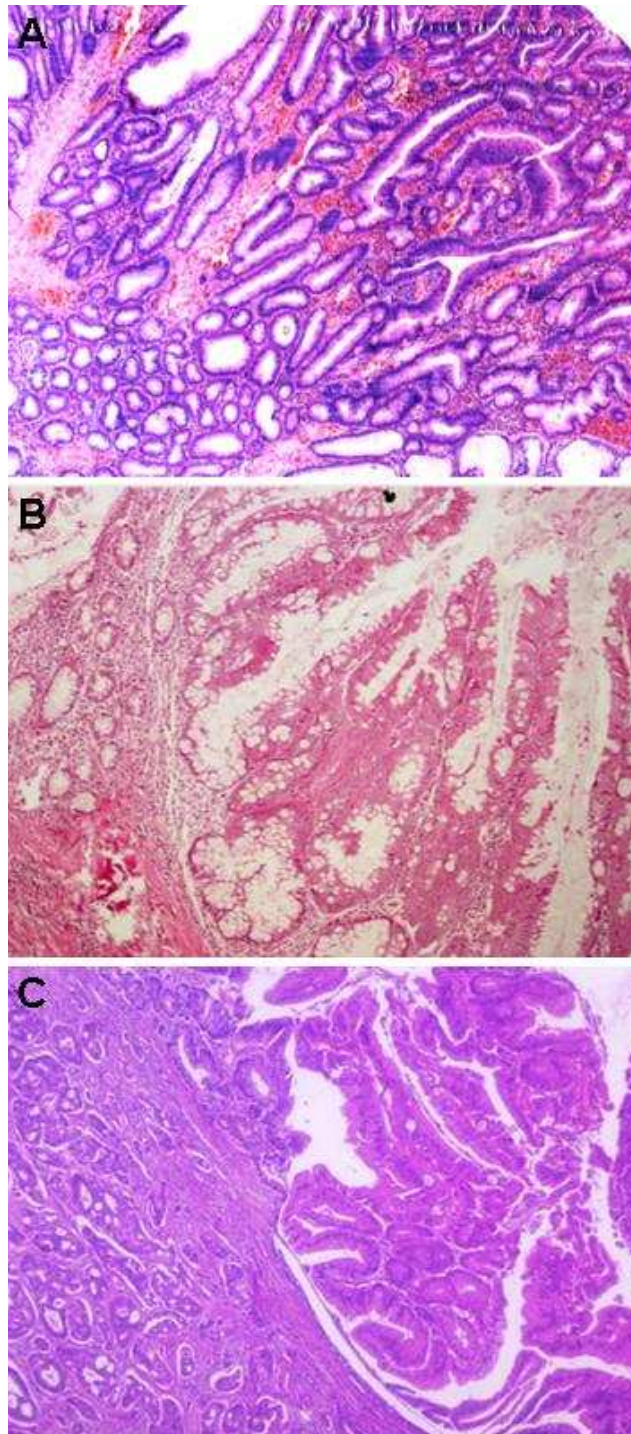
Al analizar el nivel de infiltración por el tumor, no se encontraron diferencias entre ambos grupos, siendo la mayoría de los tumores invasivos hasta la serosa y tejido graso pericolónico. En ambos grupos a pesar de tener estadios (T) avanzados, el promedio de ganglios disecados fue de 16 y el mayor de 22. El grupo de pacientes jóvenes 29 (50%) no tenía ganglios linfáticos positivos (Tabla 12).

En el grupo de pacientes jóvenes, el 22.4% de los casos presentó infiltración muscular; el 70.7% tenía infiltración en la serosa y en 3 casos se encontró infiltración en vejiga y próstata; se encontró infiltración en el tejido graso pericolónico en un solo caso. En el grupo de mayores de 50 años, el mayor porcentaje de pacientes (68.8%) presentó infiltración serosa, el 22.9% tenía infiltración muscular; un 6.25% de los pacientes presentaron infiltración en el tejido graso pericolónico y sólo hubo un caso con infiltración en vejiga y próstata (Tabla 12).

En relación con el estadio Astler y Collier, observamos que en el grupo de pacientes menores de 50 años, el mayor porcentaje de casos (39.5%) pertenecen al grupo C2, y el 31% al B2. En los pacientes mayores de 50 años, el porcentaje de casos con estadio C2 fue similar al de pacientes jóvenes (39.5%), con estadio B2 sólo se presentaron 5 casos y un 33.3% de los casos presentaron estadio C1 (Tabla 12).

El grupo de pacientes jóvenes presentó pólipos asociados al carcinoma; sin embargo, el 97.4% de los pacientes mayores de 50 años no presentó pólipos asociados (Tabla 12 y Fig 36).





**Figura 36.** **A.** En la ilustración se observa una lesión polipoide con epitelio cilíndrico y, en la lámina propia, glándulas mucosas algunas dilatadas y con moco, las cuales corresponden a un pólipo hiperplásico encontrado en uno de los especímenes. **B.** Se observa una lesión sésil con formaciones papilares altas con bifurcación en las criptas y abundante moco en la lámina propia y, tocando la muscular de la mucosa, glándulas dilatadas de aspecto irregular y con moco en su interior las cuales corresponden a un pólipo aserrado. **C.** La fotomicrografía muestra una lesión de aspecto polipoide con múltiples papilas con epitelio cilíndrico con ausencia de producción de moco y superficies rectas asociadas a un adenocarcinoma.

## Análisis Inmunohistoquímico

El 53.4% de las muestras procedentes de los pacientes jóvenes fueron positivas para MLH1, mostrando tinción nuclear en las células tumorales. El 46.5% de las muestras fueron negativas, aunque en éstas, se observó inmunotinción nuclear en las glándulas normales y en los linfocitos, tinción que sirvió de control interno. En el grupo de mayores de 50 años, el 87.5% de las muestras fueron positivas. Por tanto, la expresión de la proteína MLH1 mostró relación con la edad de los pacientes (Tabla 13 y Fig. 37).

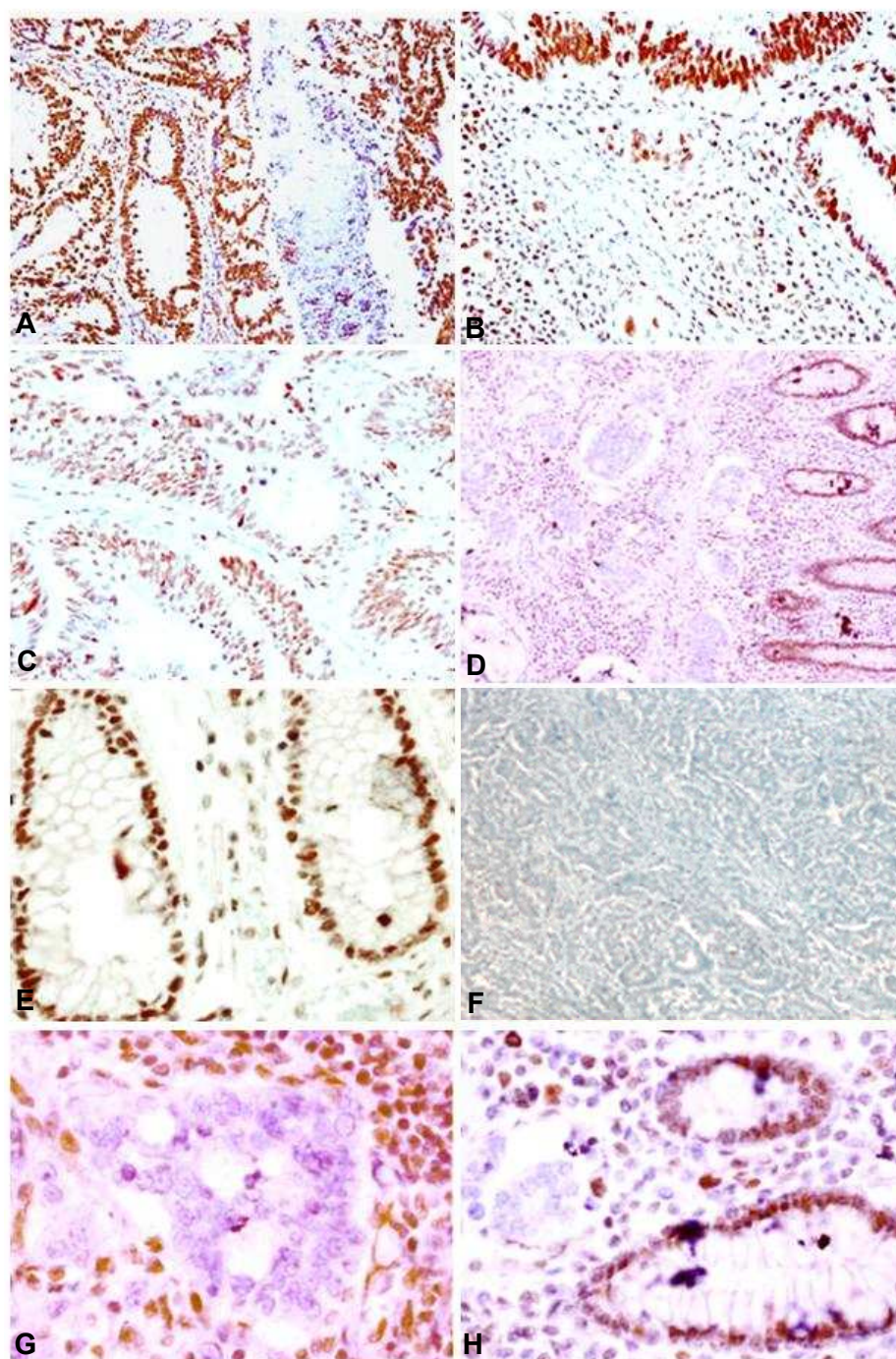
Para MSH2, se encontró expresión en la mayoría de las muestras, 86.2% en pacientes jóvenes y 97.9% en pacientes mayores. Al igual que MLH1, se observó reacción positiva en el núcleo de las células neoplásicas. Sin embargo, la expresión de MSH2 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 13 y Fig. 38).

Los resultados del análisis inmunohistoquímico se muestran en las Figs. 27 y 28.

**TABLA 13.** Características generales del cáncer colorrectal en los pacientes del estudio, estratificadas por grupos de edad.

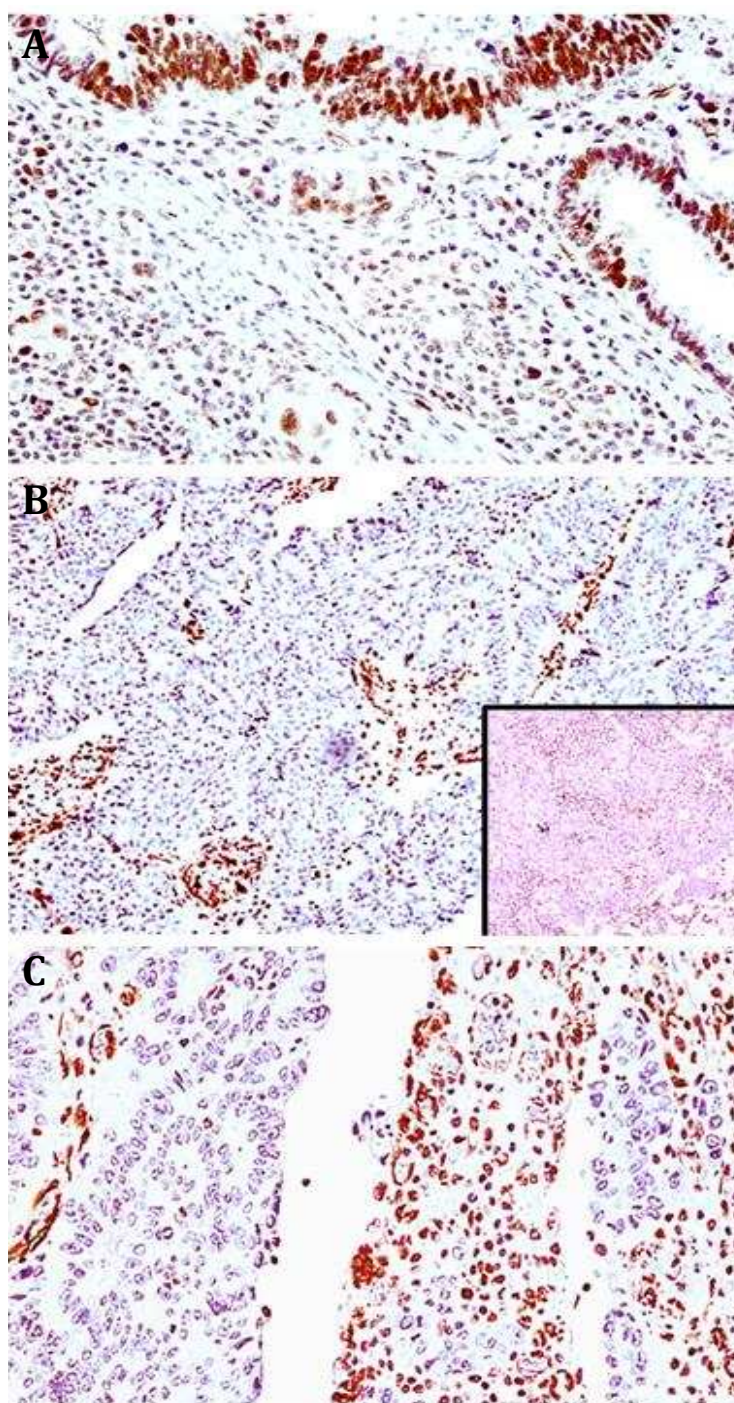
VARIABLES	Edad			
	< 50 años (n=58)	≥ 50 años (n=48)	Estadístico	p
<b>Reparación</b>				
Conservadora	30 (52.6%)	37 (77.1%)	7.94	0.047
Parcial	26 (45.6%)	11 (22.9%)		
Pérdida	1 (1.7%)			
<b>MLH1</b>				
Positivo	31 (53.4%)	42 (87.5%)	14.2	0.001
Negativo	27 (46.5)	6 (12.5%)		
<b>MSH2</b>				
Positivo	50 (86.2%)	47 (97.9%)	4.63	0.031
Negativo.	8 (13.8%)	1 (2.08%)		





**Figura 37.** A, B, C. Las tinciones de inmunohistoquímica para MLH1 en los adenocarcinomas de colon fueron positivas en el núcleo de todos los tumores que demostraron una preservación de la reparación del ADN, nótese la positividad nuclear en el estroma y los linfocitos como control interno 20X. D, E, F, G, H. En los casos de adenocarcinoma donde se perdía la expresión nuclear de MLH1 se consideró como ausencia en la preservación del mecanismo de reparación del ADN, asimismo en estos casos, como se observa en las microfotografías inferiores, las glándulas normales y los linfocitos demuestran positividad nuclear lo cual sirve de control interno. 20X y 40X.





**Figura 38.** Tinción de inmunohistoquímica para MSH2. Las células neoplásicas fueron positivas en el núcleo de los tumores con preservación del ADN y negativas en los tumores con pérdida de la reparación. Asimismo, se observa en los tumores negativos (inserción) como control interno, reacción positiva en los linfocitos y el estroma del tumor.

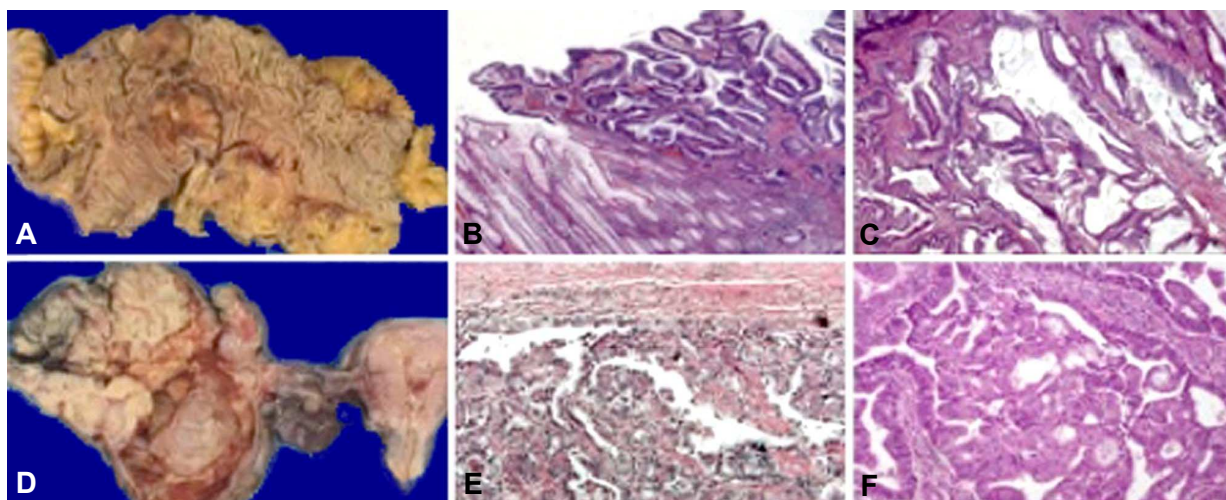
### Pacientes Jóvenes con Tumores Sincrónicos y Segundas Neoplasias con Criterios de Bethesda, Pérdida de la Reparación del ADN y Ausencia de Mutación en BRAFv600E

Se identificaron 15 pacientes menores de 50 años, todos los pacientes cumplieron con los criterios de Bethesda modificados. Los pacientes 1, 2 y 6, 7 eran familiares y ambos presentaron tumores poco diferenciados antes de los 50 años.

A todos los tumores se les realizaron tinciones de inmunohistoquímica con las proteínas de reparación MLH1 y MSH2, observándose negatividad para alguna de estas dos proteínas en forma nuclear y ausencia de la mutación de BRAFv600E.

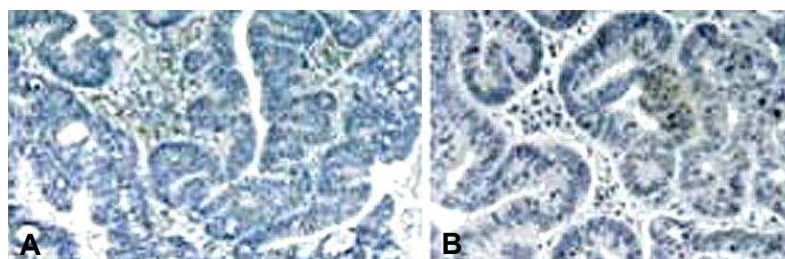
De los 11 casos observados, 9 tuvieron alteración en la expresión de MLH1, ninguno tuvo mutación en el gen BRAF y solamente dos tenían inestabilidad microsatelital, uno de éstos tuvo un hermano con la misma patología (pacientes 6 y 7), el otro tuvo un tumor metacrónico en colon y posteriormente en páncreas (paciente 3).

El estudio de las características histopatológicas de estos pacientes, mostró que en todos aparecían áreas de diferenciación mucinosa, abundantes linfocitos intraepiteliales y áreas de tipo Crohn (Tabla 12).

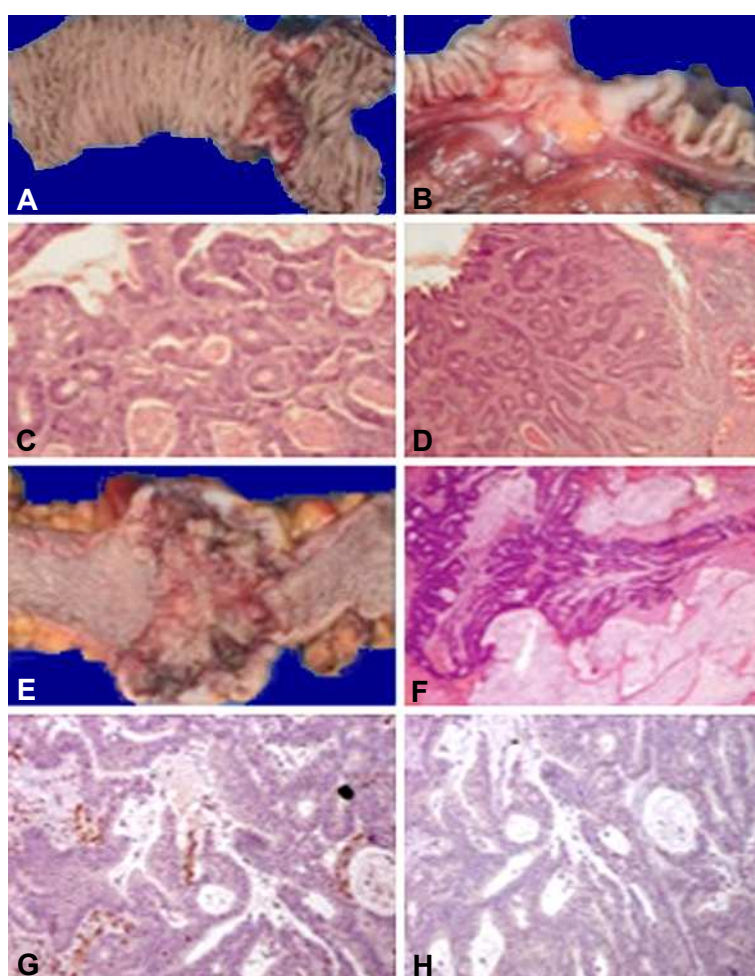


**Figura 39.** Fotomicrografías pertenecientes al paciente número 11. **A.** Fotografía macroscópica del tumor exofítico en ciego. **B.** Microfotografía de la transición tumoral con la mucosa normal del ciego (10x). **C.** Fotomicrografía del adenocarcinoma mucinoso del ciego (20x). **D.** Imagen macroscópica del tumor ovárico derecho sincrónico con endometrio. **E.** Adenocarcinoma de células claras del ovario (10x). **F.** Adenocarcinoma variedad endometriode del endometrio (20x). **3A,B.** Microfotografía de las tinciones de inmunohistoquímica mostrando negatividad para MLH1 (3A) y MSH2 (3B).





**Figura 40.** Fotomicrografías pertenecientes al paciente número 11. Tinciones de inmunohistoquímica mostrando negatividad para MLH1 (A) y MSH2 (B).



**Figura 41.** Fotomicrografías de las muestras obtenidas del paciente 13. A y B. Imágenes macroscópicas del tumor exofítico y ulcerado en intestino delgado. C y D. Imágenes histológicas del adenocarcinoma moderadamente diferenciado variedad intestinal (x20 y x10 respectivamente). E. Imagen macroscópica del tumor exofítico en el colon descendente. F. Fotomicrografía del adenocarcinoma poco diferenciado variedad mucinosa (10x). G y H. Tinciones de inmunohistoquímica mostrando negatividad para MLH1 y MSH2, respectivamente (20x).

Si consideramos el análisis de la expresión de las proteínas asociadas a reparación del ADN (Tabla 13), se observó que existe una mayor proporción de pacientes menores de 50 años con pérdida de la expresión de al menos una de las proteínas estudiadas ( $p=0.047$ ). Es importante destacar que en pacientes menores de 50 años, la pérdida de MSH2 ocurrió hasta en el 13.8% de los casos ( $p=0.031$ ). En relación con la edad y la presencia de la mutación MLH1, se obtuvo una  $r$  de Pearson de 0.289, con una  $r^2$  de 0.075 ( $p=0.003$ ); y con respecto a la presencia de la mutación MSH2, una  $r$  de 0.227 con una  $r^2$  de 0.042 ( $p=0.019$ ).

Además, se realizó un análisis de regresión logística (Tabla 14), donde se encontró asociación positiva con la presencia de la mutación MLH1 en el grupo de mayores de 50 años (OR 4.28, IC 95% 1.60-11.47) ( $p=0.02$ ); mientras que la presencia de la mutación MSH2, se encontró en una proporción similar en ambos grupos.

**TABLA 14.** Análisis de regresión logística según la presencia de mutación MLH1 y MSH2, estratificado por grupo de edad.

VARIABLE	Edad		$\chi^2$	OR (IC 95%)	$p$
	< 50 años	$\geq$ 50 años			
<b>MLH1</b> positivo	28	42	9.050	4.28 (1.60-11.47)	0.002
negativo	20	7			
<b>MSH2</b> positivo	43	47	1.967	4.37 (0.47-40.65)	0.204
negativo	4	1			

El análisis de regresión logística nos sirve para determinar una asociación causal entre dos variables, en este caso el tener menos de 50 años y presentar la mutación MLH1, por lo que de acuerdo a este resultado, interpretamos que el OR de 4.28 nos dice que en el grupo de mayores de 50 años es positiva la asociación con la mutación MLH1; es decir, un paciente con cáncer de colon mayor de 50 años tiene una probabilidad de tener la mutación MLH1 4.28 veces superior que alguien menor de 50 años. Para la mutación MSH2 también salió positiva la asociación, pero no fue significativa; por lo tanto, los dos grupos de edad tienen una frecuencia similar de la presencia de la mutación de MSH2.

## Resultados de la Selección de Casos en Forma Retrospectiva y Comparación con las Características Anatomopatológicas

De 362 casos obtenidos entre 1980 y 2000, correspondieron a carcinoma de colon un 0.24%, 185 casos (51.1%) fueron resecciones totales y 177 fueron biopsias endoscópicas (48.8%). Al reevaluar los criterios de inclusión estudiamos 90 casos (24.8%). El análisis de los resultados demostró que para los grupos de edad menores de 50 años, la frecuencia fue del 40% (36 casos), y del 60% (54 casos) para el grupo de mayores de 50 años. Si se considera el sexo, el 68.1% (15 casos) del grupo de pacientes menores de 51 años con localización izquierda fueron hombres. Mientras que en los demás grupos no hubo una diferencia en la distribución por sexo.

En pacientes menores de 51 años, 14 se presentaron en colon proximal y 22 en colon distal. En 33 pacientes del grupo III (61%) su localización fue izquierda y 21 casos (38.8%) en el lado derecho.

Los pacientes del Grupo I mostraron un predominio de tumores poco diferenciados (57.1%) mientras que los pacientes del Grupo II y III presentaron un predominio de tumores moderadamente diferenciados, 81.4% y 54.5%, respectivamente.

El análisis estadístico entre variables, reveló la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes y el grado de diferenciación, en aquellos pacientes con tumores localizados en el lado derecho ( $p < 0.021$ ), no así para los del lado izquierdo ( $p = 0.086$ ).

El tamaño tumoral en el grupo I fue mayor de 5cm en el 71% (10 casos), mientras en los grupos II y III supuso el 45.4% (10 casos) y el 57.4% (31 pacientes), respectivamente.

En relación al estadio clínico de Astler y Coller modificado, la gran mayoría de los casos se presentaron en estadios C2 (42.8%, 31.8% y 40.7%), seguido de B2 (28.5%, 40.9% y 25.9%) para cada uno de los grupos ( $p = \text{N.S.}$ ). En la prueba de Chi cuadrado, las diferencias observadas para los tres grupos en cuanto a tamaño del tumor y localización fueron estadísticamente significativas ( $p = 0.035$  y  $< 0.0001$  respectivamente), sin embargo la variable edad no fue significativa ( $p = 0.058$ ).

En cuanto a los ganglios linfáticos, entre el 50 y el 54.7% no presentaron metástasis en los grupos I, II y III.

La tabla 15 resume la selección de casos.

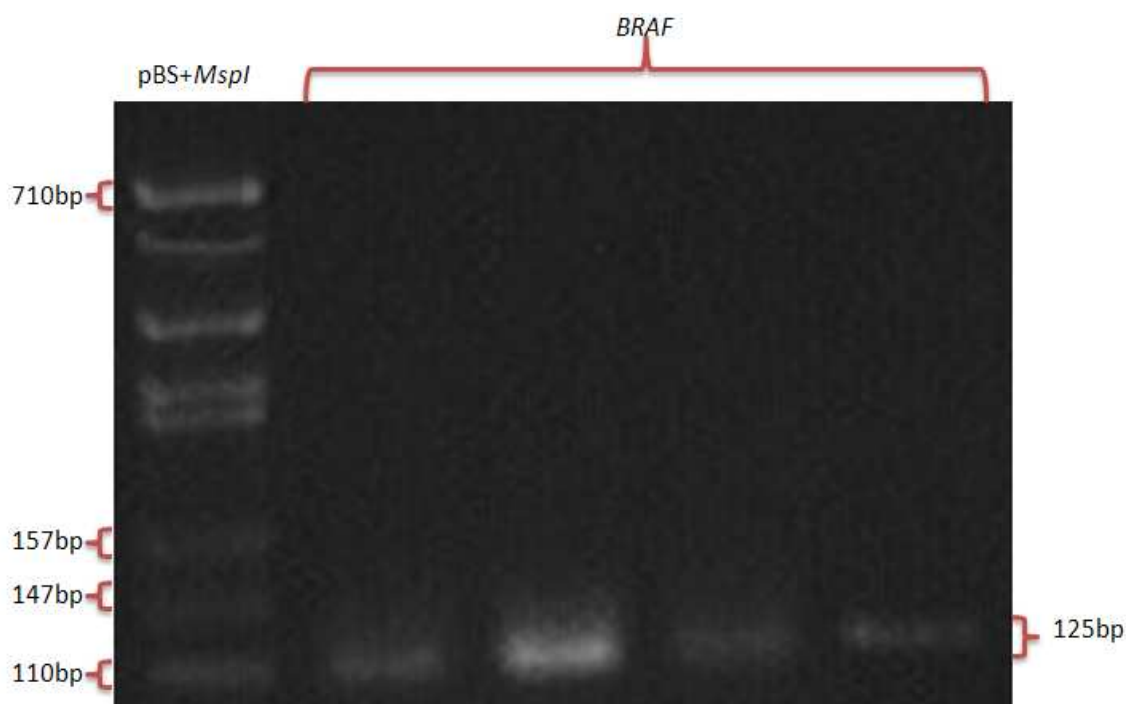
**Tabla 15.** Características de la selección de casos de forma retrospectiva

<b>Parámetro clínico patológico</b>	<b>No de casos (%)</b>
<b>Total de pacientes</b>	90
<b>Sexo</b>	
Femenino	41 (45.5%)
Masculino	49 (54.4%)
<b>Localización</b>	
Colon derecho	35 (38.8%)
Colon izquierdo	55 (61.1%)
<b>Tamaño tumoral</b>	
0-3cm	11 (12.2%)
3-5cm	28 (31.1%)
5 y mas cm.	51 (56.6%)
<b>Grado histológico</b>	
Bien diferenciado	9 (10%)
Moderadamente diferenciado	61 (67.7%)
Poco diferenciado	20(22.2%)
<b>Grado de infiltración</b>	
Limitado a la mucosa	3 (3.33%)
Muscular propia	21 (23.3%)
Serosa	66 (73.3%)
<b>Ganglios linfáticos positivos</b>	
Ninguno	46 (51.1%)
1 a 3 ganglios	16 (17.7%)
4 a 6 ganglios	10(11.1%)
7-10 ganglios	3 (3.3%)
mas de 10 ganglios	15(16.6%)
<b>Astler-Coller Modificado</b>	
A	3 (3.33%)
B1	16 (17.7%)
B2	27 (30%)
C1	5 (5.5%)
C2	35(38.8%)
D	4 (4.4%)

### **Análisis de Mutación BRAF (v600E)**

La extracción se llevó a cabo con resultados de calidad del ADN dentro de los parámetros establecidos y una cuantificación adecuada para la realización del estudio (Fig. 42).

La estandarización de la reacción para la identificación de la mutación BRAFv600E se realizó satisfactoriamente obteniéndose las curvas de amplificación para las concentraciones de 10ng, 20ng, 100ng y 1000ng de ADN.



**Figura 42.** Electroforesis en gel que muestra en el carril izquierdo el marcador de peso molecular pBS+MspI y el amplicón de 125 pb de 3 muestras en los siguientes carriles.

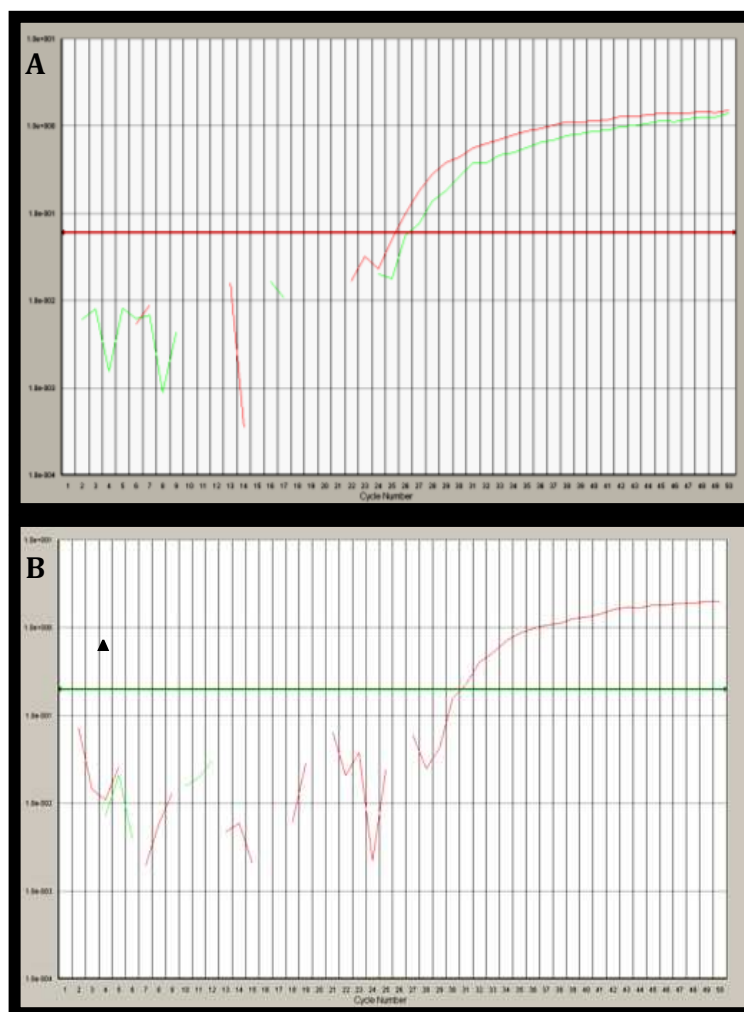
En el ADN de los pacientes mayores y menores de 50 años solo se identificó el alelo normal y en ninguno de ellos pudo identificarse la presencia de la mutación. Como puede observarse en la figura 43, correspondiente a gráficos de amplificación, sólo se obtiene la amplificación de la sonda marcada con el reportero VIC, la que corresponde a la forma salvaje, y la ausencia de fluorescencia para el reportero FAM de las sondas dirigidas a la mutación.

### **Pacientes Jóvenes con Tumores Sincrónicos y Alteraciones en MLH1/MSH2 y BRAFv600E**

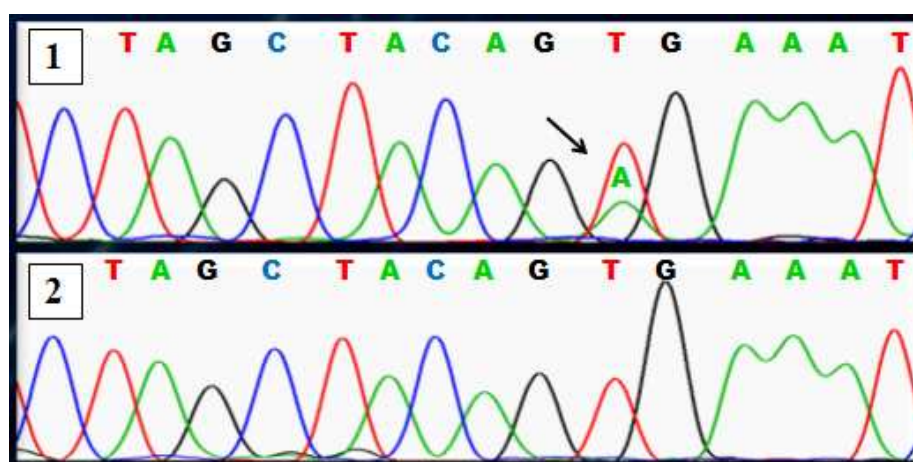
Se identificaron 9 pacientes menores de 50 años, que completaron al menos tres de los criterios de Bethesda revisados, de éstos, dos por tener familiares de primer grado (casos 1, 2 y casos 6 y 7) con carcinoma colorectal, seis presentaban tumores metacrónicos y uno presentó un tumor metacrónico además de un segundo primario en páncreas (caso 3). Ninguno de los tumores examinados presentó mutación en el gen BRAF, y solamente dos tenían inestabilidad microsatelital.

A todos los tumores se les realizaron tinciones de inmunohistoquímica con las proteínas de reparación MLH1, MSH2 y MSH6, los resultados quedan reflejados en la tabla 16 y figura 43).





**Figura 42.** PCR en tiempo real para la detección de la mutación BRAFv600E. **A.** Mutación heterocigótica de la línea celular HT29. **B.** Tejido tumoral de paciente menor de 50 años (wild type).



**Figura 43.** Análisis de la secuencia del DNA de la línea celular HT29 donde se muestra la mutación BRAFv600E de forma heterocigota (1), y la secuencia del DNA de tejido tumoral (2) de un paciente menor de 50 años.

**Tabla 16.** Análisis de las características histopatológicas e inmunohistoquímicas de los pacientes con probable síndrome de Lynch.

Paciente	Caso	Edad	Localización	Familiar	MLH1	MSH2	Mutación BRAF	IMS	Histología
Pac 1	06-6242	34	Colon transverso	Si	-	+	Neg	NA	Int
Pac 2	10-4505	37	C. desc	Si					
Pac 3	05-6568	43	Ciego	No	-	+	Neg	Si	Int MD
	08-11758	46	Trans		-	+			Medular
	10-8970	48	Páncreas		-	+			
Pac 4	08-6477	29	C transv	No	-	+	Neg	No	Muc
	08-8473	30	Ileon (ang de Treitz)		-	+			Muc
	09-1384	31	Pared abdom						Muc
Pac 5	08-NA	36	Recto	No	NA	NA	Neg	NA	NA
	09-3710	37	Ciego		+	+	Neg	No	Anillo de sello
Pac 6	05-761	44	C Ascendente	Si	-	+	Neg	Si	Mucinoso
Pac 7	01-3849	45	Sigmoides	Si	-	+	Neg	NA	Intest
Pac 8	92-6529	32	Sigmoides	No	+	+	Neg	No	Intestinal MD
	94-6605	34	Sigmoides						Intestinal
	97-5887	37	Recto						Intestinal
Pac 9	05-5611	28	Sigmoides	No	-	+	Neg	NA	Intestinal
	06-10858	30	Recto						Intestinal Poco dif
Pac 10	10-7688	49	Ciego y ovario sincrónico	No	-	+	Neg	NA	Mucinoso en colon y ovario
Pac 11	09-10018	32	Ciego	No	-	+	Neg	NA	Poco dif con cels en anillo de sello

**Tabla 16-Continuación.** Análisis de las características histopatológicas e inmunohistoquímicas de los pacientes con probable síndrome de Lynch.

Paciente	Caso	Edad	Localización	Familiar	MLH1	MSH2	Mutación BRAF	IMS	Histología
<b>Pac 12</b>	11-1436 07-11413	43	Ciego  Ovario y endometrio	Sí	-	-	Neg	Sí	Mucinoso Mixto (endometroide y cels claras)
<b>Pac 13</b>	11-2026	44	Sigmoides y Ovario	No	+	+	Neg	No	Medular, mucinoso
<b>Pac 14</b>	08-284	41	Duodeno-yeyuno	No	+	+	Neg	no	Intestinal
	11-5153	44	Descendente y sigmoides		-	-		Sí	Mucinoso
<b>Pac 15</b>	06-9365	48	Mama	No	-	-	Neg	No	Ductal
	06-10782	48	Ovario						Seroso
	11-6821	53	Recto						Medular

## DISCUSIÓN

## Epidemiología y Características Clinicopatológicas

El Carcinoma Colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más común en el mundo, supone el 8.9% de todos los cánceres, y causa 500 mil muertes al año en todo el mundo.<sup>195</sup>

El CCR es mucho más frecuente en países occidentales con una dieta baja en fibra, las tasas más altas de incidencia de cáncer colorrectal se encuentran en USA, países de Europa occidental, Australia y Nueva Zelanda, con 45 casos por cada 100.000 habitantes.<sup>8</sup> En 2008, Márquez-Villalobos *et al.*,<sup>170</sup> en un estudio realizado en cuatro hospitales de México, demostraron que el CCR es la neoplasia maligna más frecuente del tubo digestivo. Esta tendencia en el aumento de la frecuencia se empieza a publicar a mediados de los años 70. De acuerdo con el registro histopatológico de neoplasias en México, en 2001, se notificaron 102.657 tumores malignos; de ellos, 2433 fueron de colon, y 1118 de recto.<sup>226</sup>

Del estudio de esta tesis, junto con la sesión de oncología gastrointestinal del Hospital Dr. José E. González, se desprende que el cáncer más frecuente del tubo digestivo es el CCR, hallazgo que es similar a lo publicado en el resto del mundo y de la literatura mexicana.<sup>170</sup>

En el periodo de 1994 a 2010, al empezar a recolectar los casos en forma retrospectiva y prospectiva, se localizaron en los archivos del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario 128 casos de resecciones de CCR y de ellos, se seleccionaron los casos para esta tesis. Aunque no se ven reflejados en los resultados, es importante resaltar algunos hallazgos que motivaron la presente Tesis Doctoral:

- 1) 43 casos (33.6%) correspondieron a pacientes menores de 50 años; 25 de los cuales presentaban localización derecha y, 18, localización izquierda.
- 2) 85 casos (66.4%) pertenecían a pacientes mayores de 50 años, con un promedio de edad de 60 años. Entre ellos, la localización predominante fue en el colon izquierdo, con un 61.1% de los casos y, un 38.8%, en el colon derecho.
- 3) En relación al sexo, en la casuística total y en la seleccionada para el estudio, hubo una tendencia general a presentarse con mayor frecuencia en pacientes hombres jóvenes que en mujeres. En los pacientes mayores de 50 años no hubo ninguna tendencia; sin embargo, al incluir todos los casos en un mismo grupo, no existe una tendencia estadísticamente significativa para ningún sexo.

Se han realizado numerosos estudios epidemiológicos en diversas partes del mundo en relación con la frecuencia, distribución y etapas clínicas del CCR, tanto en pacientes jóvenes, como en la población general. En pacientes jóvenes está publicado que aparece en la misma proporción en ambos sexos.<sup>208,276</sup>

Sorprendentemente, una de las variables más acentuadas en nuestro medio fue la edad de presentación del carcinoma colorrectal, correspondiendo casi una tercera parte de los casos a menores de 50 años, lo cual difiere notablemente con los hallazgos en otras partes del mundo.<sup>276</sup> En México, Márquez-Villalobos *et al.*<sup>170</sup> (2008) publican una incidencia del 23.15% de carcinomas colorrectales en pacientes jóvenes y hacen referencia a un dato de Jiménez-Bobadilla *et al.*, quienes encuentran un 24% de incidencia de pacientes jóvenes con carcinoma colorrectal; también refieren las observaciones de Durán-Ramos *et al.*, quienes describen una incidencia del 9%. Estos valores llaman la atención pues los estudios mencionados son de hospitales localizados en la Región Central de México.

Existen algunas revisiones similares a este estudio, las cuales mencionan que la localización izquierda es el lugar de presentación más frecuente del CCR en hombres de cualquier edad, observación que se asemeja a lo que ocurre en el norte de México.<sup>260</sup>

En cuanto al análisis de los casos seleccionados para esta tesis es interesante mencionar que son similares a los observados en la casuística general. Si bien es cierto que podrían estar sesgados por la metodología de la muestra, es evidente que la frecuencia de CCR en pacientes jóvenes en el Noroeste de México y en nuestro hospital es diferente a otras regiones del país. Por lo tanto, son necesarios estudios multi-institucionales con diseños con estratificación por edades para demostrar si este fenómeno es real.

Numerosos estudios de otros países demuestran la importancia de detectar a pacientes jóvenes de forma temprana debido a su biología y características clinicopatológicas, que son diferentes de las de los pacientes adultos mayores.<sup>190</sup> Además, la evidencia publicada en la literatura demuestra un incremento en la frecuencia de segundas neoplasias en pacientes que padecieron un cáncer a edad temprana, causadas por síndromes hereditarios, o secundarias al manejo con quimioterapéuticos o radioterapia. En estos pacientes el comportamiento biológico de las segundas neoplasias es diferente y podría ayudar a una detección temprana e incrementar su supervivencia si son detectadas a tiempo. Así mismo, es conveniente crear programas para sus familiares y estratificarlos por riesgo de padecer un cáncer.<sup>32,126,142,149</sup> La historia familiar de CCR es un factor que parece estar asociado con una mejor supervivencia.<sup>26</sup>

## Características Anatomopatológicas

### Localización

Los resultados -considerando la localización de los casos analizados- no demostraron en forma clara una frecuencia mayor en el colon derecho respecto de la localización en el colon izquierdo en los pacientes jóvenes y adultos mayores ( $p=0.56$ , lo cual no es estadísticamente

significativo). Es evidente que la localización del CCR es un evento anatomopatológico importante. En un estudio epidemiológico realizado en Suiza, de 1960 a 1998, se demostró un aumento de 5 años en la supervivencia de los pacientes a partir de la década de los 90, con una diferencia de supervivencia del 50 al 60% para el carcinoma localizado en el recto, comparado con la localización en colon derecho, debido al retraso en el diagnóstico en esta localización.<sup>251</sup> Hemminki *et al.*<sup>105</sup> (2010) diagnostican 10.174 casos entre 2000 y 2008, y demuestran un comportamiento biológico de los CCRs en jóvenes mucho más favorable que en pacientes adultos mayores, con un rango de riesgo de 0.55 para aquellos pacientes diagnosticados antes de los 50 años, comparado con aquellos pacientes diagnosticados por encima de los 80 años; sin embargo, la localización tiene un papel menor en la supervivencia.

Los tumores localizados en el colon izquierdo tienen el más bajo rango de riesgo, comparado con los localizados en el colon derecho. Entre los lugares relacionados con peor supervivencia se encuentran los localizados en el colon transversal, siendo los carcinomas localizados en el sigmoide los que poseen mejor supervivencia. En la casuística americana realizada por Meguid *et al.*<sup>176</sup> (2008) sobre 77.978 casos, las conclusiones fueron las mismas que las del grupo suizo. No obstante, un dato importante en esta revisión es el incremento significativo de los tumores localizados en el lado derecho, con un 57.1%; sin embargo, la mediana de edad de estos pacientes fue de 71 años y no mencionan el comportamiento en jóvenes.

En el estudio de Stefanidis *et al.*<sup>243</sup> (2006), analizaron 453 pacientes hispanos registrados en la universidad de Texas (San Antonio), y refirieron una mayor frecuencia de CCR en estos pacientes hispanos ( $p < 0.001$ ), en comparación con los pacientes no hispanos. Asimismo, se observó una frecuencia más alta en pacientes jóvenes ( $p = 0.03$ ); la localización no fue diferente en ninguno de los dos grupos. Este estudio muestra características similares al nuestro en relación a la frecuencia de CCR en jóvenes y origen étnico, y, a pesar de que la localización en nuestros casos tampoco fue una característica de pacientes jóvenes, sí existe en ellos una tendencia a localizarse en el colon derecho.

Los datos descritos en la literatura son contradictorios en relación a la localización y frecuencia en pacientes adultos mayores y jóvenes; esto se debe tanto al diseño de los estudios, como a que la mayoría son estudios retrospectivos. Sin embargo, es evidente que la localización y la edad se encuentran íntimamente relacionadas con el pronóstico y las características epidemiológicas. Aunque no pudimos demostrar una relación de localización y edad en nuestro trabajo, la cantidad de casos localizados en el lado derecho es muy similar a lo descrito en la literatura.

## Tamaño Tumoral y Estadío Clínico Astler y Coller

El tamaño tumoral y la profundidad de la invasión y la extensión en el CCR son parámetros que se relacionan entre si por lo que se discutirán los hallazgos en función del estadio clínico. Además, el tamaño tumoral no se correlaciona con el comportamiento biológico o el pronóstico en CCR, lo cual ha sido demostrado en trabajos previos.<sup>45</sup>

El carcinoma de colon es una enfermedad con una morbilidad y mortalidad altas; a pesar de los grandes avances en la biología molecular y en el conocimiento de las vías de señalización y oncogénesis en cáncer de colon, aún nos falta mucho para conocer mejor la biología y el comportamiento de los CCRs. El estadio clínico sigue siendo el parámetro pronóstico más importante en cáncer de colon.<sup>46</sup> Los estadios clínicos avanzados por lo general se encuentran asociados a mal pronóstico y a una disminución en la supervivencia; habitualmente, un paciente con un tumor que invade más allá de la serosa y con ganglios positivos tiene una media de supervivencia de 22,7 meses.

En nuestros resultados, hemos observado que la mayoría de los pacientes jóvenes y adultos mayores se encontraron con estadios de Astler y Coller III y IV (ver Tabla 12). En general, revisando la literatura puede observarse que en lugares donde existen programas de detección temprana de cáncer, la posibilidad de encontrar pacientes en estadios tempranos es alta.<sup>56,116,155</sup> Por el contrario, en México, donde no existen estos programas, la frecuencia con la que se encuentran estos pacientes es rara.<sup>42,180</sup>

Según Ahmad *et al.*<sup>4</sup> (2006), los pacientes jóvenes con CCR se presentan con mayor frecuencia en estadios avanzados; si analizáramos estadio por estadio nuestros resultados, encontraríamos que existe también esta tendencia en nuestros casos, pues en los estadios Astler y Coller C y D se encuentran 29 pacientes jóvenes menores de 50 años (50%); sin embargo, al analizar los dos grupos de pacientes jóvenes y adultos no se encuentra una diferencia estadísticamente significativa. En un estudio de 453 paciente realizado por Stefanidis *et al.*<sup>243</sup> (2006), observaron que el 57% de los pacientes presentaban estadios clínicos avanzados, además, encontraron que en los hispanos, existía una tendencia estadísticamente significativa a presentarse en estadios avanzados y ninguno en estadio temprano, en comparación con pacientes afroamericanos y americanos ( $p=0.02$ ), y en pacientes menores de 45 años.

En un registro de tumores realizado en Suecia,<sup>105</sup> se ha observado que la localización es un factor predictivo importante para presentar un estadio clínico avanzado; sin embargo, es un hallazgo que ayuda poco a predecir metástasis. Asimismo, los tumores en pacientes jóvenes tienden a comportarse de manera más agresiva que en los pacientes adultos mayores.



En el estudio de Fairley *et al.*<sup>63</sup> (2006) realizado entre 1998 y 2001, se encontró que el CCR se sitúa entre los cuatro primeros cánceres en pacientes varones y mujeres entre los 40 y 49 años, independientemente de la raza; además, los hispanos fueron el segundo grupo que presentaba mayor frecuencia de CCR. De igual manera, los pacientes jóvenes, independientemente de la localización, se presentaron con estadios clínicos avanzados y con enfermedad metastásica local o a distancia. Un hecho interesante descrito en este estudio es que los porcentajes más altos de CCR fueron más frecuentes en estados del Sur de Estados Unidos. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que los estados del Norte de México que colindan con los estados de la unión americana tienen similares comportamientos epidemiológicos.

Hallazgos similares se describieron previamente en un estudio canadiense,<sup>172</sup> donde el 75% de los CCRs ocurrían en pacientes entre los 40 y 49 años. Las conclusiones de ambos estudios son que los pacientes jóvenes se presentan con enfermedad en estadios avanzados y con tumores de alto grado y poco diferenciados, en comparación con los pacientes adultos mayores. Estos factores determinan en estos pacientes un mal pronóstico.<sup>63,172</sup> Aunque en nuestros resultados los pacientes estudiados, tanto jóvenes, como adultos, no presentan una diferencia estadística significativa, la explicación más lógica es que en México no existen programas de detección temprana de CCR, como en otros países, donde el uso de la detección temprana de CCR por endoscopia, o el estudio de sangre oculta en heces, se practica desde hace tres décadas.

Considerando todo lo anteriormente discutido, podemos sugerir que los CCRs en jóvenes tienen al menos cierta tendencia a ser diferentes cuando se les compara con los de los adultos mayores. Otro hallazgo interesante es la positividad en ganglios linfáticos en pacientes jóvenes, que fue más frecuente comparada con la de los adultos mayores. Fairley *et al.*<sup>63</sup> (2006) y (Marret *et al.*<sup>172</sup> (2002) destacan la frecuencia con lo que esto sucede en pacientes menores de 50 años. Concluimos también que las prospecciones de nuestros especímenes fueron adecuadas, el promedio de ganglios linfáticos disecados fue en todos los casos mayor a 15. En el estudio de Parsons *et al.*<sup>198</sup> (2011) el número de ganglios linfáticos evaluados se correlaciona con la posibilidad de localizar enfermedad metastásica. En este sentido concluimos que todos nuestros casos fueron evaluados con un número ideal de ganglios linfáticos para su correcto estadiaje.

La evidencia de todos estos estudios, incluyendo el nuestro, aconseja a las autoridades sanitarias evaluar la posibilidad de crear programas de detección de cáncer colorrectal en pacientes jóvenes, sobre todo en aquellos donde los antecedentes de CCR en sus familiares son frecuentes.<sup>155</sup>

## Histopatología

Las variedades histológicas medular, anillo de sello y mucinosa, por definición en la clasificación de la Organización mundial de la Salud,<sup>93</sup> son variedades poco diferenciadas. En nuestro estudio estas tres variedades fueron las más frecuentes en pacientes jóvenes, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes adultos mayores, donde la variedad intestinal fue la más frecuente. En un estudio comparativo entre pacientes jóvenes y adultos mayores, Vilches *et al.* (2010) encontraron esta misma tendencia, con una mayor cantidad de pacientes jóvenes con las variedades histológicas antes mencionadas y una mayor frecuencia de adenocarcinomas de variedad intestinal en pacientes adultos mayores.

La importancia de este hallazgo nuevamente es la tendencia significativa en pacientes jóvenes a presentar tumores de alto grado, aunque la graduación es muy subjetiva, el diagnóstico de estas variedades histológicas tiene criterios estrictos y fáciles de evaluar cuando se tiene una cantidad adecuada de secciones histológicas para su evaluación. En nuestro análisis, estudiamos al menos 4 secciones de tumor en cada paciente. El grado histológico ha demostrado ser un parámetro importante para medir el comportamiento biológico y pronóstico en pacientes con CCR e independiente del estadio clínico.<sup>47</sup>

El carcinoma medular es un tumor caracterizado por crecimiento en nidos sólidos con un intenso infiltrado linfocitario que involucra los nidos neoplásicos. En este estudio identificamos 13 carcinomas medulares. Esta variedad se asocia además con inestabilidad microsatelital, alteraciones en los genes relacionados con la reparación del ADN y con el síndrome hereditario no polipósico familiar.<sup>16,43,123,234</sup>

La segunda y tercera variedad más frecuentes fueron los adenocarcinomas mucinosos (18 casos) y anillo de sello (9 casos), en los pacientes adultos mayores sólo clasificamos 6 del primero y 2 del segundo, más del doble de casos con una tendencia evidente a ser más frecuentes en pacientes jóvenes.

Los carcinomas mucinosos y en anillo de sello se relacionan con un pobre pronóstico, principalmente si se localizan en el recto sigmoidees o en pacientes menores de 45 años, y cuando son comparados estadio por estadio con adenocarcinomas de variedad intestinal.<sup>181</sup>

En resumen, la evidencia actual, es sólida en el sentido de que únicamente las variedades histológicas en CCR con un significado pronóstico son el adenocarcinoma con células en anillo de sello y los carcinomas medulares. Los adenocarcinomas mucinosos se relacionan con un buen pronóstico cuando se encuentran asociados a inestabilidad microsatelital. Es evidente además, que el diagnóstico apropiado de estas variedades

histológicas debe ser detallado en el informe, con el objetivo de realizar pruebas para detectar alteraciones moleculares propias de estos tumores e identificar pacientes en forma temprana.<sup>120,123,241</sup>

## Lesiones Precursoras

El CCR no se desarrolla sin la presencia de pólipos. Aunque esta parte del estudio tiene varios sesgos debido a que el análisis retrospectivo de algunos de los casos se realizó cuando fue posible, evaluamos la variedad de las lesiones polipósicas encontradas en forma de lesiones aisladas o relacionadas como lesiones precursoras en el adenocarcinoma (Tabla 5).

En pacientes jóvenes el pólipo más frecuente fue el aserrado (17 pacientes) y el túbulo vellosos (18 pacientes adultos mayores). Mientras que los pólipos serrados son considerados en algunas series como lesiones hiperplásicas, observaciones clínicas patológicas y estudios moleculares han demostrado su potencial de convertirse en lesiones malignas, además de tener alteraciones moleculares relacionadas con inestabilidad microsatelital, y presentarse en pacientes jóvenes y en el colon derecho.<sup>121</sup>

Los pólipos serrados fueron descritos por Longacre y Fenoglio-Preiser<sup>162</sup> en 1990, remplazando al término de pólipo mixto, hiperplásico y adenomatoso. La descripción original incluyó el estudio de 18000 lesiones polipoides, de las cuales el 0.6% correspondió a carcinoma intramucoso. Dos tercios de estas lesiones fueron clasificadas previamente como pólipos hiperplásicos benignos.<sup>258</sup> La frecuencia de estas lesiones es del 2.3 al 5% de las lesiones resecadas endoscópicamente.<sup>80</sup> Una diferencia importante entre los adenomas serrados y los adenomas convencionales es que estos últimos se originan a través de la vía de alteraciones del gen APC, mientras que los primeros se originan a través de la vía CIMP+inestabilidad microsatelital. Análisis recientes demuestran que los pólipos serrados tiene una progresión neoplásica más rápida, cuando se comparan con los adenomas convencionales.<sup>224</sup>

En una reciente revisión de Rosty *et al.*<sup>217</sup> (2011), se evalúan las variables de la presencia de pólipos serrados y CCR; es interesante destacar la frecuencia con la que estas lesiones se presentan en pacientes jóvenes y con historia familiar de CCR.

Esta evidencia sugiere que en pacientes jóvenes con adenocarcinomas con inestabilidad microsatelital y con poliposis no adenomatosa familiar, el desarrollo de carcinomas sea más frecuente a edad temprana, a diferencia de pacientes que presentan adenomas colónicos esporádicos o síndrome de poliposis familiar hereditaria.

La frecuencia con que estos pólipos se encontraron en los pacientes jóvenes en realidad no se puede evaluar adecuadamente debido al sesgo que existe en los casos retrospectivos; sin embargo, es evidente que este fenómeno está sucediendo y que necesita una atención específica.

## **Inmunohistoquímica: Proteínas Relacionadas con la Reparación del ADN**

La técnica de inmunohistoquímica es una metodología que utiliza anticuerpos y sistemas de detección para el estudio de proteínas presentes en los tejidos. Los patólogos quirúrgicos utilizan esta técnica en el diagnóstico de lesiones neoplásicas, infecciosas y, en las últimas dos décadas, como una herramienta para la selección de pacientes que puedan ser dianas de terapias moleculares.

En la presente Tesis Doctoral, investigamos la presencia o ausencia de inestabilidad microsatelital en CCR, de pacientes jóvenes y adultos mayores. Esta mutación ocurre en segmentos cortos de ADN, conocidos como regiones microsatélite. Las mutaciones que ocurren en los segmentos repetidos dan por resultado un incremento en el tamaño (suma de nucleótidos) o reducción del tamaño (pérdida de nucleótidos); los cambios relacionados con estos dos fenómenos se denominan inestabilidad microsatelital (IMS).

La causa de esta IMS es la deficiencia o pérdida del sistema de reparación del ADN (MMR, del inglés *Mismatch Repair*), este sistema necesita de la función de varias proteínas de reparación del ADN (hMLH1, hMLH2, hMLH6, hPMS2, hMSH3 y hMLH3); esta maquinaria multiproteica es responsable de la corrección de errores de las bases del ADN que suceden durante la división celular; un sistema funcional de reparación corrige los errores al detectar secuencias defectuosas, separándolas y colocando las correctas.<sup>82,201</sup> La pérdida de la expresión estudiada en tejidos identifica tumores con inestabilidad microsatelital, lo cual se considera un defecto en la replicación del ADN.

La inmunohistoquímica es un método simple para evaluar proteínas relacionadas con el sistema de reparación del ADN y existen en el mercado anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas proteínas hMLH1, hMLH2, hMLH6, hPMS2, hMSH3 y hMLH3. Las células con los genes de MMR intactos y las células con una sola copia del gen del MMR muestran positividad nuclear, mientras que las células con inactivación de ambas copias muestran negatividad nuclear, ya sea por pérdida en la línea germinal o por inactivación epigenética (metilación).<sup>230,241</sup>

La inmunohistoquímica tiene la ventaja de ser una metodología de acceso fácil en cualquier laboratorio de patología y es una técnica de rutina utilizada en la mayoría de los

laboratorios. Además, estas pruebas sirven como método de cribado para identificar cuál de los genes del sistema de reparación de ADN está inactivado y seleccionar pacientes para análisis mutacional, técnica que no está accesible en cualquier laboratorio y es un procedimiento de alto coste económico.<sup>253</sup>

El uso de material de archivo, o incluso material de archivo de otros laboratorios, puede ocasionar dificultades técnicas a la hora de conseguir resultados reproducibles para la detección de proteínas MMR. Esto es causado por las diferentes formas de procesamiento del tejido e incluso por el uso de diferentes sistemas de detección y protocolos de recuperación antigénica.<sup>220</sup>

En los materiales utilizados en esta Tesis, decidimos desde su revisión seleccionar casos que se encontraran en óptimas condiciones, tanto morfológicas, como de fijación, para obtener los mejores resultados. En los casos seleccionados de forma retrospectiva desconocíamos los tiempos de fijación y sólo se consideraron aquellos casos con morfología óptima; mientras que en los casos seleccionados desde 1994, que fue la fecha en que se comenzó a tener registro y control del procesamiento de tejidos para inmunohistoquímica, pensamos que no habría ningún problema.

En relación a la metodología mediante la cual realizamos el protocolo de tinción, decidimos seguir el criterio de Hansen *et al.*<sup>95</sup> (2006), quienes recomiendan el uso de soluciones de recuperación antigénica a pH alto y de un sistema de detección basado en polímero. Asimismo, incluimos en cada caso un control de apéndice cecal o, a veces, de micromatrices de múltiples tejidos, ya que todas las células normales expresan las proteínas de MMR y no existe dificultad para demostrar su positividad real. En los casos problema de CCR siempre contamos con estroma y linfocitos y, en la mayoría de los casos, criptas colónicas normales, las cuales sirvieron como control interno positivo. En ninguno de los casos tuvimos dificultad para evaluar la positividad nuclear en los controles internos o externos.

Los estudios más relevantes evaluando la inmunohistoquímica como un factor predictivo de IMS han demostrado una especificidad del 100% y una sensibilidad del 92%.<sup>158,219</sup>

Está descrito que proteínas funcionalmente inactivas pueden ser detectadas por inmunohistoquímica, favoreciendo la posibilidad de falsos negativos para IMS.<sup>253</sup> Tumores con mutaciones no puntuales del sistema MMR pueden tener proteínas significativamente reducidas y presentar cierto grado de expresión nuclear, principalmente para MLH1 con una expresión desproporcionada en el tejido control interno.

El objetivo fundamental del estudio de proteínas MMR es la detección de pacientes con CCRNP. Si consideramos los antecedentes descritos en la introducción, sabemos que estos

pacientes desarrollan a edad temprana CCR, por lo que para detectarlos decidimos diseñar un estudio comparativo con pacientes mayores de 50 años, pero teniendo en cuenta que un 15% de los pacientes adultos mayores con carcinomas esporádicos pueden tener también esta alteración de las proteínas MMR por inactivación epigenética de los genes MMR.<sup>174,179</sup> Considerando estas dos premisas, el grupo de mayores de 50 años serviría como un grupo comparativo para saber si este fenómeno es más frecuente en pacientes jóvenes.

El impacto fundamental de esta Tesis es la justificación de buscar estrategias para detectar pacientes jóvenes portadores de probable síndrome de Lynch, pues es importante disminuir su mortalidad y reducir el riesgo de segundas neoplasias, así como el riesgo de sus familias para desarrollar CCR u otras neoplasias relacionadas con el Síndrome de Lynch.<sup>190,191</sup>

La alta sensibilidad de la inmunohistoquímica, para detectar posibles casos de CCR con mutaciones en la línea germinal, favorece el uso de esta metodología en la detección de pacientes con alteraciones en las proteínas MMR,<sup>231,233</sup> sin embargo, se debe hacer una buena selección de las proteínas a analizar. El uso exclusivo de MLH1 tiene la peor sensibilidad (48%), debido a que su expresión está frecuentemente relacionada con fenómenos de hipermetilación del promotor, además de ser uno de los marcadores con un patrón de tinción más heterogéneo dentro del mismo tumor; asimismo, ha sido destacado como un evento frecuente en los resultados de diferentes instituciones del grupo internacional cooperativo para el estudio de CCRNP.<sup>16,169</sup>

MSH2 es un marcador con un potencial adecuado para la detección de posibles casos de CCRNP debido a que su promotor se encuentra demetilado, pues la mutación en la línea germinal es una de las causas más frecuentes.<sup>237</sup> En nuestros casos encontramos una asociación frecuente de ausencia de expresión de las proteínas MMR, MLH1 y MSH2, en pacientes jóvenes, aunque el índice de correlación entre ellas no fue significativo (0.36 y 0.2, respectivamente); sin embargo, la inmunohistoquímica es un método de tamizaje en la búsqueda de pacientes con posibles alteraciones moleculares en los genes MMR, por lo cual la metodología es adecuada para seleccionar pacientes en los que comprobar la ausencia o presencia de alteraciones moleculares.

De otra parte, la inmunohistoquímica es muy sensible para detectar pacientes con IMS alta, pero tiene poca sensibilidad para detectar IMS baja.<sup>16</sup> Además, la falta de expresión de MLH1 en pacientes jóvenes con CCR esporádico es poco frecuente. Por tanto, la edad de presentación del CCR es un dato importante para evaluar este fenómeno; asimismo, la ausencia de expresión de MSH2 en pacientes mayores de 50 años es un fenómeno raro, como observamos en nuestros casos (1 paciente). Nuevamente, la explicación es que el

silenciamiento epigenético por metilación del promotor MLH1 y MSH2 es dependiente de la edad.<sup>82,134</sup>

En 7 de nuestros casos de pacientes jóvenes se observó la pérdida de ambos marcadores de MMR. Numerosos factores pudieron haber contribuido a este resultado, incluyendo la heterogeneidad de tinción, sobre todo para MLH1, por las razones anteriormente expuestas.

La mayoría de los CCR hereditarios son diagnosticados en pacientes jóvenes. Los resultados de esta Tesis demuestran que hay un grupo de pacientes en el Noroeste del país con este posible riesgo, y que concuerdan con la evidencia descrita en múltiples publicaciones. Asimismo, hemos descrito en párrafos anteriores que la frecuencia de variedades histológicas, mucinosa, medular y anillo de sello se correlacionan con la presencia de este fenómeno en pacientes jóvenes.

El 10 a 15% de los CCRs se caracterizan por inserciones y deleciones de secuencias repetitivas de ADN (IMS). El resultado del mal funcionamiento de este sistema de proteínas relacionadas con la reparación del ADN (MMR) es la inestabilidad genómica de la célula. La consecuencia de esta alteración es la pérdida de la integridad del ADN en su estado después de la mitosis. Del 7 al 10% de los CCR esporádicos demuestran alteración en la expresión de MLH1 por hipermetilación de su promotor, y el 3% de los pacientes con CCRNP o síndrome de Lynch presentan mutaciones en la línea germinal en alguna de las proteínas involucradas en la reparación del ADN. Los CCR con IMS tienen un cariotipo estable y las mutaciones se presentan en genes específicos, principalmente TGF $\beta$ -RII, Caspasa-5, BAX, hMSH6, hMSH6, hMSH3, AXIN2, TCF4 y MBD4. Los CCR con IMS se localizan con mayor frecuencia en el colon proximal, son poco diferenciados, de histología mucinosa y con intenso infiltrado inflamatorio linfocítico.<sup>7,148,200</sup>

En los pacientes estudiados, la ausencia de expresión para MLH1 en pacientes jóvenes y adultos mayores fue más frecuente en forma global comparada con la ausencia de expresión para MSH2. Este fenómeno se ha descrito ampliamente en la literatura y discutido en párrafos anteriores.

## **Análisis Mutacional BRAF**

BRAF es un gen localizado en el brazo del cromosoma 7q34 y codifica una proteína miembro de la familia Raf quinasa de las proteínas quinasas específicas de serina/treonina. Esta proteína ejerce un papel fundamental en la regulación de las cascadas de señalización de las MAP quinasas/ERKs que intervienen en la división celular, diferenciación y secreción y ha

sido descrito en una gran diversidad de cánceres humanos,<sup>54</sup> especialmente en pacientes con CCR con IMS.<sup>211</sup>

Las mutaciones de BRAFv600E (substitución de valina por ácido glutámico) han sido descritas en pacientes con CCR esporádicos, y rara vez en pacientes con mutaciones en la línea germinal para MLH1, MSH2 o MSH6; de acuerdo con esta evidencia se puede suponer que la ausencia de mutación en un CCR es consistente con un CCR con mutación en la línea germinal y, por ende, con la presencia de un CCRNP o síndrome de Lynch.<sup>55,58</sup> Por consiguiente, la hipótesis es que todos nuestros pacientes jóvenes serían unos buenos candidatos para realizar esta prueba y definir si podrían ser pacientes con CCRNP, la ausencia de esta mutación hace poco probable que estos pacientes tengan mutaciones en la línea germinal y, por lo tanto, necesitan estudios moleculares adicionales para poderlos identificar.

Es evidente que el estudio de la mutación de BRAF es costo-efectiva en el estudio de aquellos pacientes con IMS o en los que presentan ausencia de la expresión de la proteína MLH1 por inmunohistoquímica.<sup>127,228</sup>

La gran mayoría de las metodologías para detectar mutaciones de BRAFv600E son complicadas, por esta razón decidimos utilizar la metodología descrita por Benlloch *et al.*<sup>17</sup> (2006), ya que presenta un 100% de sensibilidad y de especificidad.

La estandarización de la reacción para la identificación de la mutación BRAFv600E se realizó satisfactoriamente, obteniéndose las curvas de amplificación para las concentraciones de 10ng, 20ng, 100ng y 1000ng de ADN en todos los pacientes estudiados.

En el ADN de los pacientes mayores y menores de 50 años solo se identificó el alelo normal y en ninguno de ellos pudo identificarse la presencia de la mutación. Estos resultados son interesantes, primero porque al principio pensamos que existía un error en la metodología al no encontrar ninguna mutación en los pacientes adultos mayores, por lo que decidimos realizar una prueba de secuenciación en 5 pacientes al azar, pero no encontramos la mutación en los pacientes, solo en la línea celular HT29.

Las mutaciones de BRAFv600E en CCR son poco frecuentes (<10%) y suelen estar relacionadas con un fenotipo metilador (CIMP); cuando este fenotipo está presente se detectan en casi el 70%.<sup>271</sup> Teniendo en cuenta estas dos consideraciones, la ausencia de mutaciones en nuestros pacientes mayores de 50 años podría explicarse de varias formas: porque el tamaño de la muestra estudiada sea pequeño o que no pertenezca al fenotipo metilador CIMP e, incluso, que las diferencias regionales, étnicas y geográficas tengan un papel importante en este fenómeno; o bien, por las diferentes variedades moleculares de CIMP y sus vías de progresión, como señala Kang<sup>136</sup> (2011). En este contexto, se sugiere que los CCR con IMS



son heterogéneos, destacando que la mutación de BRAF se encuentra más frecuentemente en pacientes mayores (70 años o más), tumores poco diferenciados y con un intenso infiltrado linfocitario, asociados a la presencia de CIMP e IMS, cuando se les compara con pacientes con ausencia de CIMP e IMS.<sup>136</sup>

Los resultados de nuestra investigación demuestran que la gran mayoría de los pacientes adultos mayores tenían tumores moderadamente diferenciados, de aspecto polipoide, y con ausencia de infiltrado linfoide, en comparación con los pacientes jóvenes menores de 50 años, los cuales presentaron tumores poco diferenciados, con crecimiento sólido endofítico, y con presencia de infiltrado linfoide.

Explicar la ausencia de mutación BRAFv600E es más difícil en aquellos pacientes menores de 50 años con alteraciones en la expresión de proteínas MLH1 y MSH2. El CCR es una enfermedad neoplásica heterogénea, con características patológicas y comportamiento clínico relacionados con tres diferentes patrones moleculares, INC, IMS y CIMP. Los cuatro subtipos moleculares de CCR se definen por las combinaciones del estado de la IMS y CIMP, y difieren con respecto a las características demográficas y clínicas, pronóstico, respuesta a tratamiento, genes activados o inactivados y sus características histopatológicas.

En nuestro estudio se demostró que el grupo de pacientes jóvenes se presenta con características especiales relacionadas con lo discutido anteriormente.

### **Pacientes Jóvenes con Tumores Sincrónicos y Segundas Neoplasias con Criterios de Bethesda, Pérdida de la Reparación del ADN y Ausencia de Mutación BRAFv600E**

Se identificaron 15 pacientes menores de 50 años, todos los pacientes cumplieron con los criterios de Bethesda modificados. Los pacientes 1, 2 y 6, 7 eran familiares y ambos presentaron tumores poco diferenciados antes de los 50 años.

A todos los tumores se les realizó tinciones de inmunohistoquímica con las proteínas de reparación MLH1 y MSH2, observándose negatividad para alguna de estas dos proteínas en forma nuclear y, por tanto, ausencia de la mutación BRAFv600E.

De los 15 casos, 9 tuvieron alteración en la expresión de MLH1, ninguno presentó mutación en el gen BRAF, uno de éstos tuvo un hermano (pacientes 6 y 7), y otro tuvo un tumor metacrónico en colon y posteriormente en páncreas (paciente 3).

El estudio de las características histopatológicas de estos pacientes mostró, en todos, áreas de diferenciación mucinosa, abundantes linfocitos intraepiteliales y áreas similares a Crohn (ver Tabla 7).

Es evidente que con lo discutido anteriormente se observa que el 25% de nuestros pacientes menores reunieron al menos dos criterios de Bethesda para incluirlos como potenciales portadores de Síndrome de Lynch.

### **Pacientes Jóvenes con CCR Temprano, Criterios de Bethesda y Ausencia de Mutación BRAFv600E**

El CCR es una neoplasia frecuente en jóvenes. Es evidente que alguna alteración genética, ambiental, socioeconómica o de raza son factores importantes en su génesis y epidemiología en el Noroeste de México. Aunque la evaluación de todos estos parámetros no era uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral, sí hemos considerado la posibilidad de estudiar a nuestros pacientes jóvenes con los criterios de Bethesda para poderlos incluir en un probable síndrome de Lynch; ésta es una enfermedad hereditaria que se adquiere en forma autosómica dominante y se caracteriza por la presencia de carcinoma colorrectal temprano y un incremento en el riesgo de cánceres de endometrio, estómago, ovario, tracto urinario, hepatobiliar, páncreas e intestino delgado.<sup>175</sup>

Los criterios de Bethesda consideran: 1) paciente con diagnóstico de CCR antes de los 50 años; 2) paciente con dos neoplasias extraintestinales relacionadas (endometrio, ovario, urotelio, sistema nervioso central, estómago, vías biliares, intestino delgado y piel), que sean sincrónicas o metacrónicas, u otro tumor independientemente de la edad; 3) diagnóstico de CCR antes de los 50 años y asociado a inestabilidad microsatélite (IMS); 4) al menos dos generaciones consecutivas afectadas; 5) CCR en uno o más familiares de primer grado con una neoplasia extraintestinal asociada y que, al menos una de éstas, sea diagnosticada antes de los 50 años y; 6) paciente con CCR con 2 o más familiares de primer o segundo grado con una neoplasia extraintestinal asociada, independientemente de la edad. Escogimos este sistema en lugar de los criterios de Amsterdam por ser clínicamente más flexible ya que se podían incluir pacientes tanto con características clínicas, como por antecedentes familiares, así como por encontrar segundas neoplasias o CCR sincrónicos y metacrónicos o con alteración en la expresión de las proteínas MMR.

Aunque los criterios anteriores no son criterios diagnósticos, sugieren que todos los pacientes menores de 50 años con CCR tienen un alto riesgo de sufrir carcinoma colorrectal hereditario no polipósico (síndrome de Lynch). La frecuencia con la que el uso de estos criterios detecta a probables pacientes portadores de síndrome de Lynch es del 82 al 94% y son de utilidad para identificar a los pacientes a quienes deben practicarse estudios moleculares de extensión para los genes asociados a IMS.

Los detalles de nuestros resultados los ilustramos en la tabla 5: 4 pacientes eran familiares y presentaron CCR antes de los 50 años. Todos los pacientes presentaron al menos una alteración en la expresión de las proteínas relacionadas con IMS (MLH1/MSH2), además de presentar tumores poco diferenciados, mucinosos o variedad medular con linfocitos intraepiteliales.

Numerosos estudios en la literatura favorecen el uso de criterios de Bethesda como un sistema mejor y más adecuado para la búsqueda de pacientes con síndrome de Lynch, pues permite identificar pacientes tanto por los datos clínicos como por la patología y favorece el uso de estudios de cribaje como la inmunohistoquímica para proteínas asociadas a IMS, MLH1 y MSH2.<sup>90-92</sup> Esta metodología de cribaje es recomendada por su alta sensibilidad y correlación con estudios de biología molecular, además de ser un estudio que se encuentra al alcance de cualquier laboratorio de patología, como estudio de rutina en especímenes quirúrgicos o biopsias.<sup>182,237,241</sup>

Hampel *et al.*<sup>94</sup> (2008) sugieren que todos los pacientes con CCR menores de 50 años deberían ser estudiados, incluso con estudios de biología molecular en búsqueda de posibles alteraciones en la vía de MMR. Sin embargo, el alto costo de estos estudios supone que su estandarización en algunos laboratorios sea muy compleja. Recientemente, se han utilizado mutaciones somáticas en el oncogen BRAFv600 para identificar pacientes con síndrome de Lynch.<sup>54</sup> Aproximadamente el 10% de los CCR tienen mutaciones en BRAF y casi siempre está presente la v600.<sup>267</sup> Existe una alta asociación entre la ausencia de la mutación de BRAF y CCR con IMS, por lo cual se recomienda como un método sensible y específico para identificar pacientes con síndrome de Lynch.<sup>58</sup>

En los resultados de nuestros casos de pacientes jóvenes con CCR no identificamos la mutación BRAFv600, lo cual nos sugiere una asociación con la alteración en la vía del MMR y, sumado con las características histopatológicas y con los resultados de la inmunohistoquímica para proteínas MLH1 y MSH2, conlleva al posible diagnóstico de síndrome de Lynch.

Es importante diagnosticar correctamente a los pacientes con síndrome de Lynch y diferenciarlos de los que no lo son, pues se les puede ofrecer a los familiares consejo genético e incluirlos en estudios de seguimiento para prevenir y tratar las segundas neoplasias relacionadas con éste.

Aunque la evidencia en esta Tesis es sólida en los resultados, es imperativo continuar evaluando y validando con otros estudios de biología molecular esta serie de pacientes con el objeto de evidenciar en forma más certera si existe realmente una alteración molecular, sobre todo en aquellos pacientes donde la historia familiar de CCR temprano está documentada y

donde existe la posibilidad de demostrar ausencia de mutaciones de BRAF.<sup>159</sup> Esta última posibilidad abre una oportunidad para aquellos pacientes jóvenes con CCR en los cuales no pudimos demostrar alteraciones en la IMS por inmunohistoquímica o por ausencia de mutación BRAF.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

**PRIMERA.** Las características clínico-patológicas del cáncer colorrectal (CCR) en pacientes jóvenes de la población del Noroeste de México en el Hospital Universitario Dr. José E González son diferentes a las de los adultos mayores. Los pacientes jóvenes tienen tumores poco diferenciados de variedades de grado alto y su frecuencia de presentación es diferente, con significación estadística, en comparación con la de los pacientes adultos mayores.

**SEGUNDA.** La expresión de proteínas relacionadas con IMS, MLH1 y MSH2 es mayor en pacientes jóvenes. Asimismo, se puede suponer que las alteraciones de estas proteínas en pacientes adultos mayores se encuentran relacionadas con otras alteraciones genéticas o con la heterogeneidad en la expresión de estas proteínas en pacientes con alteraciones epigenéticas por metilación (CIMP bajo o intermedio).

**TERCERA.** El análisis mutacional de BRAFv600E demostró ser una prueba adecuada para la evaluación de pacientes jóvenes con CCR, ya que ninguno mostró la presencia de la mutación. Sólo se observó presente en la línea celular de CCR, y los datos concuerdan con la ausencia de expresión de proteínas MLH1 y MSH2 en los pacientes estudiados.

**CUARTA.** En pacientes adultos la ausencia de la mutación podría explicarse por el reducido grupo de pacientes que se utilizaron para comparar los hallazgos con las proteínas de reparación MLH1 y MSH2 y la baja frecuencia de la mutación en CCR esporádico (10%).

**QUINTA.** La búsqueda de criterios de Bethesda en nuestros pacientes nos permitió identificar 15 pacientes con características de Síndrome de Lynch por medio de datos clínicos, morfológicos, expresión de proteínas de reparación del ADN y análisis mutacional de BRAFv600E.

## RESUMEN

**Introducción.** Un tercio de los carcinomas colorrectales se presentan en pacientes jóvenes por debajo de los 50 años de edad, el 15% de éstos se relacionan con inestabilidad microsatelital debida a mutaciones en la línea germinal de los genes relacionados con la reparación del ADN. La otra proporción de carcinomas colorrectales tienen alteraciones epigenéticas por hipermetilación e inactivación epigenética del sitio promotor del gen hMLH1, en donde la mutación del gen BRAFv600 es un evento característico. La inmunohistoquímica ayuda a clasificar este tipo de carcinomas con una especificidad del 100% y un 92% de sensibilidad.

**Objetivos.** Demostrar si la edad es un factor de riesgo para la ausencia de expresión de proteínas relacionadas con la reparación del ADN (MMR) y mutaciones del gen BRAF en nuestra población y compararlos con sus hallazgos histopatológicos.

**Material y Métodos.** Se realizaron estudios de Inmunohistoquímica para MLH1 y MSH2 y RT PCR para BRAFv600 y secuenciación en el tejido obtenido de 57 pacientes menores de 50 años. Se documentaron la edad, sexo, tipo histológico, profundidad de la invasión y la cantidad de ganglios linfáticos disecados y con enfermedad metastásica, entre estos pacientes se buscaron además aquellos que reunieran criterios de Bethesda para poderlos clasificar como probable síndrome de Lynch. Asimismo, se usaron 48 pacientes mayores de 50 años como grupo control. En el análisis estadístico se utilizaron las pruebas estadísticas de ANOVA,  $\chi^2$ , y correlación de Spearman.

**Resultados.** La ausencia de expresión de proteínas relacionadas con MMR fue más frecuente en pacientes con CCR menores de 50 años. No encontramos mutaciones en ninguno de los dos grupos. Las variedades Medular y Mucinosas fueron más frecuentes en los pacientes jóvenes, mientras que la intestinal fue más frecuente en el grupo de adultos mayores ( $p=0.0008$ ). No hubo diferencias significativas relacionadas con el estadio patológico de los grupos.

Identificamos 15 pacientes jóvenes con CCR con uno o dos criterios de Bethesda, sea por alteración en expresión de proteínas relacionadas con MMR, historia familiar de CCR u otros tumores relacionados con síndrome de Lynch.

**Conclusiones.** Se demostró en este trabajo que efectivamente la ausencia de expresión de proteínas relacionadas con la reparación de ADN es más frecuente en pacientes jóvenes.

No se encontraron mutaciones del gen BRAFv600 en ninguno de los dos grupos.



Se describe de forma novel el primer grupo de pacientes con probable síndrome de Lynch mediante criterios de Bethesda.

**Palabras Clave.** Carcinoma colorrectal, BRAFv600, Proteínas de reparación del ADN, Mexico.

## SUMMARY

**Background.** A third of colorectal carcinomas (CRC) affects patients under 50 years. Fifteen percent of CRC cases with microsatellite instability are due to inherited germ-line mutations in DNA mismatch repair genes. The rest have an epigenetic hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in whom the BRAFv600E mutation is a common hallmark. Immunohistochemistry helps classifying colorectal cancers with 100% specificity and 92% sensitivity.

**Aims.** To determine if age is a risk factor for defective MMR protein expression and BRAF mutations in our population and to compare these results with the histopathologic tumor features.

**Materials and methods.** Immunohistochemistry for MLH1 and MSH2 and RT-PCR BRAFv600 mutation was performed on tissue specimens from 57 patients < 50 years of age by Real time PCR and sequentiation. Data on age, gender, tumor location, histologic type, depth of infiltration, and the presence of metastatic lymph nodes were collected, once we collect this that we among the young individuals with colorectal cancer if between them it will fit the Bethesda criteria in order to classify them like a probable Lynch syndrome. Forty eight patients >50 years of age were used as a control group. A statistical analysis using ANOVA,  $\chi^2$ , and Spearman's rho test were performed.

**Results.** Absent MMR protein expression was more prevalent in patients under 50 years. No BRAF mutations were detected in either group. Medullary and mucinous types were more prevalent among young patients, while intestinal type was more frequent in older patients ( $P=0.0008$ ). No differences were found regarding clinicopathological stages between groups.

We found a group of 15 patients among young individuals with colorectal carcinoma with one o more of two Bethesda criteria either by alteration of MMR proteins expression, family history of colorectal carcinoma or other tumors realted to Lynch syndrome.

**Conclusions.** We found an association between young age and defective MMR expression. No v600E BRAF mutations were detected in either group.

We describe also the first group of young individuals that fit in probable Lynch Syndrome by the Bethesda criteria.

**Key words.** Colorectal cancer, BRAFv600E, mismatch repair protein, Mexico.

## REFERENCIAS

1. **Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al.** Clues to pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812-816.
2. **Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Järvinen HJ.** Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 1995;64:430-433.
3. **Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen HJ.** Cancer risk in mutation carriers of DNA- mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81:214-218.
4. **Ahmad M, Din J, Qayum A, Afridi V.** Young colorectal patients present with advance stage disease. *J Med Sci* 2006;14:51-54.
5. **Ahuja N, Baylin SB.** Sub-classification of microsatellite-unstable tumors in colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2007;3:212-219.
6. **Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW.** Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 2003;34:369-376.
7. **Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR.** Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001;158: 527-535.
8. **Amersi F, Agustin M, Ko CY.** Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and health services. *Clin Colon Rectal Surg* 2005;18:133-140.
9. **Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL.** Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998;50:197-263.
10. **Arai T, Kino I.** Morphometrical and cell kinetic studies of normal human colorectal mucosa. Comparison between the proximal and the distal large intestine. *Acta Pathol Jpn* 1989;39:725-730.
11. **Araki K, Furuya Y, Kobayashi M, Matsuura K, Ogata T, Isozaki H.** Comparison of mucosal microvasculature between the proximal and distal human colon. *J Electron Microscop (Tokyo)* 1996;45:202-206.
12. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:255-260.
13. **Balmain A.** Cancer. Exploring the bowels of DNA methylation. *Curr Biol* 1995;5:1013-1016.
14. **Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM, Lièvre A, Cortet M, Bouvier AM, Rat P, Roignot P, Faivre J, Laurent-Puig P, Piard F.** Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer* 2008;122:2255-2259
15. **Beart RW, Melton LJ 3rd, Maruta M, Dockerty MB, Frydenberg HB, O'Fallon WM.** Trends in right and left-sided colon cancer. *Dis Colon Rectum* 1983;26:393-398.
16. **Bellizzi AM, Frankel WL.** Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol* 2009;16:405-417.
17. **Benlloch S, Payá A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R, Castells A, Llor X, Aranda FI, Massuti B.** Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. *J Mol Diagn* 2006;8:540-543.
18. **Bergers G, Coussens LM.** Extrinsic

- regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:120-127.
19. **Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D.** Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 1999;284:808-812.
  20. **Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, Jewell SD, Mayer RJ, Goldberg RM, Saltz LB, Warren RS, Redston M.** Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol* 2009;27:1814-1821.
  21. **Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P, Grabowski M, Keller G, Holinski-Feder E, Hartmann A, Hofstaedter f, Dietmaier W.** Distinction of hereditary non-polyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR. *Clin Cancer Res* 2007;13:3221-3228.
  22. **Bhatia S, Pratt CB, Sharp GB, Robison LL.** Family history of cancer in children and young adults with colorectal cancer. *Med Pediatr Oncol* 1999;33:470-475.
  23. **Bhatia S, Sklar C.** Second cancers in survivors of childhood cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:124-132.
  24. **Bienz M, Clevers H.** Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000;103:311-320.
  25. **Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, Runswick S, Cummings JH, O'Neill IK.** Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis* 1996;17:515-523.
  26. **Birgisson H, Ghanipour A, Smedh K, Pahlman L, Glimelius B.** The correlation between a family history of colorectal cancer and survival of patients with colorectal cancer. *Fam Cancer* 2009;8:555-561.
  27. **Bishop JM.** The molecular genetics of cancer. *Science* 1987;235:305-311.
  28. **Blanes A, Diaz-Cano SJ.** Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol* 2006;12:5932-5940.
  29. **Bockstaele L, Coulonval K, Kooken H, Paternot S, Roger PP.** Regulation of CDK4. *Cell Div* 2006;1:25
  30. **de Boer JG.** Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. *Mutat Res* 2002;509:201-210.
  31. **Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sudrasky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodrigues- Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S.** A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-5257.
  32. **Boutron MC, Faivre J, Quipourt V, Senesse P.** Family history of colorectal tumours and implications for the adenoma-carcinoma sequence: a case control study. *Gut* 1995;37:830-834.
  33. **Boyle P, Langman JS.** ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 2000;321:805-808.
  34. **Browning J, Gannon B.** Mucosal microvascular organization of the rat colon. *Acta Anat (Basel)* 1986;

- 126:73-77. [doi:10.1159/000146191].
35. **de Bruin JH, Ligtenberg MJ, Nagengast FM, Adang EM, Van Krieken JH, Hoogerbrugge N.** Optimizing the detection of hereditary non-polyposis colorectal cancer: an update. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2006;243:146-152.
  36. **Bryan TM, Cech TR.** Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:318-324.
  37. **Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR.** Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 1995;14:4240-4248.
  38. **Bufill JA.** Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med* 1990;113:779-788.
  39. **Burgart LJ.** Testing for defective DNA mismatch repair in colorectal carcinoma. a practical guide. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:1385-1389.
  40. **Butt AJ, Firth SM, Baxter RC.** The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol* 1999;77:256-262.
  41. **Chang DK, Ricciardiello L, Goel A, Chang CL, Boland CR.** Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J Biol Chem* 2000;275:18424-18431.
  42. **Charúa-Guindic L, Lagunes-Gasca A, Villanueva-Herrero J, Jiménez-Bobadilla B, Avendaño-Espinosa O, Charúa-Levy E.** Comportamiento epidemiológico del cáncer de colon y recto en el Hospital General de México. Análisis de 20 años: 1988-2007. *Rev Gastroenterol Mex* 2009;74:99-104.
  43. **Chiang JM, Chen MC, Changchien CR, Chen JS, Tang R, Wang JY, Yeh CY, Fan CW, Tsai WS.** Favorable influence of age on tumor characteristics of sporadic colorectal adenocarcinoma: patients 30 years of age or younger may be a distinct patient group. *Dis Colon Rectum* 2003;46:904-910.
  44. **Christofori G, Semb H.** The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999;24:73-76.
  45. **Compton CC.** Updated protocol for the examination of specimens removed from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1016-1025.
  46. **Compton CC.** Pathologic staging of colorectal cancer – an advanced user's guide. *Pathol Case Rev* 2004;9:150-162.
  47. **Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP.** American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 2000;88:1739-1757.
  48. **Costello JF, Plass C.** Methylation matters. *J Med Genet* 2001;38:285-303.
  49. **Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S.** Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992;11:1921-1929.
  50. **Counter CM, Hahn WC, Wei W, Caddle SD, Beijersbergen RL, Lansdorp PM, Sedivy JM, Weinberg RA.** Dissociation between in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci*

- USA** 1998;95:14723-14728.
51. **Cox R.** Human cancer predisposition and the implications for radiological protection. *Int J Radiat Biol* 1994; 66:643-647.
  52. **Cruz-Bustillo Clarens D.** Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2004;96:48-59.
  53. **Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, Feinberg AP.** Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003;299:1753-1755.
  54. **Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Rig- gins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-954.
  55. **Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen B, Truta B, Sleisenger M, Kim YS.** BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10: 191-195.
  56. **Derwinger K, Gustavsson B.** Variations in demography and prognosis by colon cancer location. *Anticancer Research* 2011;31: 2347-2350.
  57. **DiSario JA, Foutch PG, Mai HD, Pardy K, Manne RK.** Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in asymptomatic, average-risk men. *Am J Gastroenterol* 1991; 86:941-945.
  58. **Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, Westra J, Frebourg T, Espín E, Armengol M, Hamelin R, Yamamoto H, Hofstra RM, Seruca R, Lindblom A, Peltomäki P, Thibodeau SN, Aaltonen LA, Schwartz S Jr.** BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004;41:664-668.
  59. **Duesberg P, Stindl R, Li R, Hehlmann R, Rasnick D.** An- euploidy versus gene mutation as cause of cancer. *Curr Sci (USA)* 2001;81:490-499.
  60. **Enblad P, Adami HO, Bergström R, Glimelius B, Krusemo U, Pahlman L.** Improved survival of patients with cancers of the colon and rectum? *J Natl Cancer Inst* 1988;80:586-591.
  61. **Evan G, Littlewood T.** A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281:1317-1322.
  62. **Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB.** Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res* 2002;62:7213-7218.
  63. **Fairley TL, Cardinez CH, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B, Jamison P.** Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer* 2006;107: S1153-S1161.
  64. **Fante R, Benatti P, di Gregorio C, De Pietri S, Pedroni M, Tamassia MG, Percesepe A, Rossi G, Losi L, Roncucci L, Ponz de Leon M.** Colorectal carcinoma in different age groups: a population-based invest- igation. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:1505-1509.



65. **Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA.** Phenotype of mice lacking functional deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 1997;386:796-804.
66. **Fearon E, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, Vogelstein B.** Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990;247:49-56.
67. **Fearon ER, Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
68. **Fogar P, Basso D, Pasquali C, De Paoli C, Sperti C, Roveroni G, Pedrazzoli S, Plebani M.** Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res* 1997;17:1227-1230.
69. **Fogt F, Rahemtulla A, Jian B.** Colonic serrated pathway lesions: Molecular and histologic changes in serrated colonic proliferations (Review): *Mol Med Report* 2008;1: 21-26.
70. **Folkman J.** Tumor angiogenesis. In: Cancer Medicine. Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW, Weich-Selbaum RR (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins, 1997. Pp: 181-204.
71. **Folkman J, Kalluri R.** Cancer without disease. *Nature* 2004;427: 787.
72. **Fornasarig M, Viel A, Valentini M, Capozzi E, Sigon R, De Paoli A, Della Puppa L, Boiocchi M.** Microsatellite instability and MHL1 and MSH2 germline defects are related to clinicopathological features in sporadic colorectal cancer. *Oncol Rep* 2000;7:39-43.
73. **Foulds L.** Experimental study of tumor progresión. Vol I-III. London, Academic Press, 1954.
74. **Frayling IM, Beck NE, Ilyas M, Dove-Edwin I, Goodman P, Pack K, Bell JA, Williams CB, Hodgson SV, Thomas HJ, Talbot IC, Bodmer WF, Tomlinson IP.** The APC variants I1307K and E1317Q are associated with colorectal tumors, but not always with a family history. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10722-10727.
75. **Friedenreich C, Norat T, Steindorf K, Boutron-Ruault MC, Pischon T, Mazuir M, Clavel-Chapelon F, Linseisen J, Boeing H, Bergman M, Johnsen NF, Tjønneland A, Overvad K, Mendez M, Quirós JR, Martinez C, Dorronsoro M, Navarro C, Gurrea AB, Bingham S, Khaw KT, Allen N, Key T, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Orfanou N, Krogh V, Palli D, Tumino R, Panico S, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Monninkhof E, Berglund G, Manjer J, Ferrari P, Slimani N, Kaaks R, Riboli E.** Physical activity and risk of colon and rectal cancers: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2398-2407. [doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0595].
76. **Gatta G, Faivre J, Capocaccia R, Ponz de Leon M.** Survival of colorectal cancer patients in Europe during the period 1978-1989. EURO CARE Working Group. *Eur J Cancer* 1998;34:2176-2183. [doi:10.1016/S0959-8049(98)00327-X].
77. **Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert P, Benhattar J, Secic M, Wexner S, Givel JC, Belin B.** Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rectum* 2001;44:364-373. [doi:10.1007/BF02234734].
78. **Gervaz P, Bucher P, Morel P.** Two colons-two cancers: paradigm shift

- and clinical implications. *J Surg Oncol* 2004;88:261-266. [doi:10.1002/jso.20156].
79. **Giancotti FG, Ruoslahti E.** Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-1032.
  80. **Goldstein NS.** Clinical significance of (sessile) serrated adenomas: another piece of the puzzle. *Am J Clin Pathol* 2005;123:329-330.
  81. **Goldstein NS.** The gray area between heritable and cancer somatic (tumor phenotype) molecular genetic testing of colorectal adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 2006;125:813-814.
  82. **Gologan A, Sepulveda AR.** Microsatellite instability and DNA mismatch repair deficiency testing in hereditary and sporadic gastro-intestinal cancers. *Clin Lab Med* 2005;25:179-196.
  83. **Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon K, Willis J, Markowitz S.** Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:3101-3104.
  84. **Green DR, Amarante-Mendes GP.** The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. *Results Probl Cell Differ* 1998;24:45-61.
  85. **Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB, Trougouboff P, Tomsho LD, Kim E, Low M, Almog R, Rennert G, Gruber SB.** Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2003;27:563-570.
  86. **Gruber SB.** New developments in Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology* 2006;130: 577-587.
  87. **Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S.** Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69-77.
  88. **Guyot F, Faivre J, Manfredi S, Meny B, Bonithon-Kopp C, Bouvier AM.** Time trends in the treatment and survival of recurrences from colorectal cancer. *Ann Oncol* 2005;16:756-761. [doi:10.1093/annonc/mdi151].
  89. **Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA.** Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* 1999;400:464-468.
  90. **Halford S, Sasieni P, Rowan A, Wasan H, Bodmer W, Talbot I, Hawkins N, Ward R, Tomlinson I.** Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* 2002;62:53-57.
  91. **Hameed F, Goldberg PA, Hall P, Algar U, van Wijk R, Ramesar R.** Immunohistochemistry detects mismatch repair gene defects in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2006;8:411-417.
  92. **Hamilton SR.** Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2008; 21:S23-S30.
  93. **Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH, Fogt F, Winawer SJ, Goldgar DE, Jass JR.** Tumours of the colon and rectum. In: Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System. Hamilton SR, Aaltonen LA (eds). World Health Organization Classification of

- Tumours. Lyon, France, IARC Press, 2000, 101-142.
94. **Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Clendenning M, Sotamaa K, Prior T, Westman JA, Panescu J, Fix D, Lockman J, LaJeunesse J.** Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5783-5788.
  95. **Hansen TP, Nielsen O, Fenger C.** Optimization of antibodies for detection of the mismatch repair proteins MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 using a biotin-free visualization system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14: 115-121.
  96. **Harfe BD, Jinks-Robertson S.** DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* 2000; 34:359-399.
  97. **Hayflick L.** The cell biology of aging *Clin Geriatr Med* 1985;1:15-27.
  98. **Hayflick L.** How and Why We Age. New York, Ballantine Books, 1994.
  99. **Hayflick L.** The future of ageing. *Nature* 2000;408:267-269.
  100. **Hayflick L.** "Anti-aging" is an oxymoron. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2004 59:B573-578.
  101. **Hayflick L, Moorhead PS.** The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.
  102. **Hazra TK, Izumi T, Maitt L, Floyd RA, Mitra S.** The presence of two distinct 8-oxoguanine repair enzymes in human cells: their potential complementary roles in preventing mutation. *Nucleic Acids Res* 1998;26:5116-5122.
  103. **Hecht SS, Hoffmann D.** Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 1988;9:875-884.
  104. **Heinimann K, Müller H, Dobbie Z.** Microsatellite instability in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342: 1607-1608.
  105. **Hemminki K, Santi I, Weires M, Thomsen H, Sundquist J, Bermejo JL.** Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes. *BMC Cancer* 2010;10:688.
  106. **Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, Tops C, Breuning M, Bröcker-Vriends A, Vasen H, Fodde R, Morreau H.** Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol* 2003;162:469-477.
  107. **Herman JG, Baylin SB.** Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-2054.
  108. **Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB.** Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-6875.
  109. **Hinoue T, Weisenberger DJ, Pan F, Campan M, Kim M, Young J, Whitehall VL, Leggett BA, Laird PW.** Analysis of the association between CIMP and BRAFV600E in colorectal cancer by DNA methylation profiling. *PLoS ONE* 2009;4:e8357. [doi: 10.1371/journal.pone.0008357].
  110. **Hitchins MP, Ward RL.** Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2009;46:793-802.
  111. **Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G,**

- Suter CM, Martin DI, Hawkins NJ, Ward RL. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356:697-705.
112. Hong Z, Jiang J, Hashiguchi K, Hoshi M, Lan L, Yasui A. Recruitment of mismatch repair proteins to the site of DNA damage in human cells. *J Cell Sci* 2008; 121:3146-3154.
  113. Hotchkiss JH. Preformed N-nitroso compounds in foods and beverages. *Cancer Surv* 1989;8:295-321.
  114. Huerta S. Recent advances in the molecular diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:277-288.
  115. Huerta S, Gao X, Saha D. Mechanisms of resistance to ionizing radiation in rectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9:469-480.
  116. Hung KE, Chung DC. Colorectal cancer screening: today and tomorrow. *South Med J* 2006;99: 240-246.
  117. Iacopetta B. Predictive values of sex and tumour site for survival benefit from 5FU in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86:1524-1525.
  118. Iacopetta B, Li WQ, Grieu F, Ruzskiewicz A, Kawakami K. BRAF mutation and gene methylation frequencies of colorectal tumours with microsatellite instability increase markedly with patient age. *Gut* 2006;55:1213-1214.
  119. Irby K, Anderson WF, Henson DE, Devesa SS. Emerging and widening colorectal carcinoma disparities between Blacks and Whites in the United States (1975-2002). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:792-797.
  120. Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomäki P, De La Chapelle A, Mecklin JP. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000;118:829-834.
  121. Jass JR. Serrated adenoma of the colorectum and the DNA-methylator phenotype. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;8:398-405.
  122. Jass JR. Re: Ward et al. Routine testing for mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer is justified. *J Pathol* 2005;207:377-384. *J Pathol* 2006;208:590-591.
  123. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50: 113-130.
  124. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
  125. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, Waring PM, Ruzskiewicz AR, Pollett AF, Redston M, Barker MA, Baron JA, Casey GR, Dowty JG, Giles GG, Limburg P, Newcomb P, Young JP, Walsh MD, Thibodeau SN, Lindor NM, Lemarchand L, Gallinger S, Haile RW, Potter JD, Hopper JL, Jass JR; Colon Cancer Family Registry. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007;133:48-56.
  126. Jenkinson HC, Hawkins MM, Stiller CA, Winter DL, Marsden HB, Stevens MC. Long-term population-based risks of second malignant neoplasms after childhood cancer in Britain. *Br J Cancer* 2004;91:1905-1910.
  127. Jensen LH, Lindebjerg J, Byriel L, Kolvraa S, Crüger DG. Strategy in clinical practice for classification of unselected colorectal tumours based on mismatch repair deficiency. *Colorectal Dis* 2008;10:490-497.

128. **Ji BT, Devesa SS, Chow WH, Jin F, Gao YT.** Colorectal cancer incidence trends by subsite in urban Shanghai, 1972-1994. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:661-666.
129. **Jin Pok K, Young-Sang C, Seung-Ik A.** A Clinical Analysis for the 92 Cases of Colorectal Cancer in young Male Patients. *J Korean Cancer Assoc* 1991;23:357-361.
130. **Jiricny J, Nyström-Lahti M.** Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:157-161.
131. **Johnson JP.** Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 1991;10:11-22.
132. **Jones PA, Baylin SB.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-428.
133. **Kaiser U, Auerbach B, Oldenburg M.** The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1996;20:389-395.
134. **Kakar S, Burgart LJ, Thibodeau SN, Rabe KG, Petersen GM, Goldberg RM, Lindor NM.** Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age. *Cancer* 2003;97:1421-1427.
135. **Kane MF, Loda M, gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R.** Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57:808-811.
136. **Kang GH.** Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:698-703.
137. **Karp JE, Broder S.** Molecular foundations of cancer: new targets for intervention. *Nat Med* 1995;1:309-320.
138. **Kazama Y, watanabe T, kanazawa T, Kazama S, Tada T, Tanaka J, Nagawa H.** Mucinous colorectal cancers with chromosomal instability: a biologically distinct and aggressive subtype. *Diagn Mol Pathol* 2006;15:30-34.
139. **Kievit W, de Bruin JH, Adang EM, Ligtenberg MJ, Nagengast FM, van Krieken JH, Hoogerbrugge N.** Current clinical selection strategies for identification of hereditary non-polyposis colorectal cancer families are inadequate: a meta-analysis. *Clin Genet* 2004;65:308-16.
140. **Kim JI, Park YJ, Kim KH, Kim JI, Song BJ, Lee MS, Kim CN, Chang SH.** hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:956-960.
141. **Kinzler KW, Vogelstein B.** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.
142. **Klein G, Michaelis J, Spix C, Wibbing R, Eggers G, Ritter J, Kaatsch P.** Second malignant neoplasms after treatment of childhood cancer. *Eur J Cancer* 2003;39:808-817.
143. **Knudson AG.** Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10914-10921.
144. **Knudson AG.** Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 2000;34:1-19.
145. **Knudson AG.** Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:157-162.
146. **Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A, Peltomäki P.** Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-

- unstable colorectal cancers. *Am J Pathol* 2000;156:1773-1779.
147. Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovicova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Peltomäki P, Kolodner RD, Nibert M, Lindblom A. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:291-299.
  148. Laghi L, Bianchi P, Malesci A. Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability. *Oncogene* 2008;27:6313-6321.
  149. LaQuaglia MP, Heller G, Filippa DA, Karasakalides A, Vlamis V, Wollner N, Enker WE, Cohen AM, Exelby PR. Prognostic factors and outcome in patients 21 years and under with colorectal carcinoma. *J Pediatr Surg* 1992;27:1085-1090.
  150. Larsson SC, Rutegard J, Bergkvist L, Wolk A. Physical activity, obesity, and risk of colon and rectal cancer in a cohort of Swedish men. *Eur J Cancer* 2006;42:2590-2597. [doi:10.1016/j.ejca.2006.04.015].
  151. Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer* 2006;119:2657-2664. [doi:10.1002/ijc.22170].
  152. Leach FS, Polyak K, Burrell M, Johnson KA, Hill D, Dunlop MG, Wyllie AH, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1996;56:235-240.
  153. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-627.
  154. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002;89:845-860.
  155. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Levin TR, Pickhardt P, Rex DK, Thorson A, Winawer SJ; American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group; US Multi-Society Task Force; American College of Radiology Colon Cancer Committee. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin* 2008;58:136-160.
  156. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.
  157. Li M, Li JY, Zhao AL, Gu J. Colorectal cancer or colon and rectal cancer? Clinicopathological comparison between colonic and rectal carcinomas. *Oncology* 2007;73:52-57. [doi:10.1159/000120628].
  158. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M, Thibodeau SN. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:1043-1048.
  159. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, Gallinger S, Bapat B, Aronson M, Hopper J, Jass J, LeMarchand L, Grove J, Potter J, Newcomb P, Terdiman JP, Conrad P, Moslein G, Goldberg R, Ziogas A, Anton-Culver H, de Andrade M, Siegmund K, Thibodeau SN,

- Boardman LA, Seminara D.** Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005;293:1979-1985.
160. **Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW.** Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169-174.
  161. **Liu T, Yan H, Kuismanen S, Percesepe A, Bisgaard ML, Pedroni M, Benatti P, Kinzler KW, Vogelstein B, Ponz de Leon M, Peltomäki P, Lindblom A.** The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001;61:7798-7802.
  162. **Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM.** Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1990;14:524-5237.
  163. **Lotem J, Sachs L.** Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia* 1996;10:925-931.
  164. **Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ.** Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966;117:206-212.
  165. **Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR.** Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-1549.
  166. **Maestro ML, Vidaurreta M, Sanz-Casla MT, Rafael S, Veganzones S, Martinez A, Aguilera C, Herranz MD, Cerdan J, Arroyo M.** Role of the BRAF mutations in the microsatellite instability genetic pathway in sporadic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14:1229-1236.
  167. **Mäkinen MJ, George SM, Jernvall P, Mäkelä J, Vihko P, Karttunen TJ.** Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol* 2001;193:286-294.
  168. **Maldonado-Garza H.** Cancer de colon ¿en Mexico? *Rev Gastroenterol Mex* 2001;66:169.
  169. **Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Fischer HP, Merkelbach-Bruse S, Ohlendorf M, friedrichs N, Aretz S, Buettner R, Propping P, Mathiak M.** Tumours from MSH2 mutation carriers show loss of MSH2 expression but many tumours from MLH1 mutation carriers exhibit weak positive MLH1 staining. *J Pathol* 2005;207:385-395.
  170. **Marquez-Villalobos FO, Ambriz-González G, Romo-Sandoval HV, Velázquez-Ramírez GA, Alvarez-Villaseñor AS, González-Ojeda A.** Predictores clínicos de etapificación en cancer colorrectal. *Cir Cir* 2008;76:311-315.
  171. **Marra G, Schär P.** Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J* 1999;338:1-13.
  172. **Marrett LD, Frood J, Nishri D, Ugnat AM; Cancer in Young Adults in Canada (CYAC) Working Group.** Cancer incidence in young adults in Canada: preliminary results of a cancer surveillance project. *Chronic Dis Can* 2002;23:58-64.
  173. **Massagué J.** TGF-beta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 1996;85:947-950.
  174. **McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL, Kambara T, Spring KJ, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, Simms**

- LA, Leggett BA, Young J, Jass JR. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polypoidis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer* 2004; 3:101-107.
175. Mecklin JP, Järvinen HJ. Tumor spectrum in cancer family syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Cancer* 1991;68:1109-1112.
  176. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right-versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol* 2008;15: 2388-2394.
  177. Minardi AJ Jr, Sittig KM, Zibari GB, McDonoald JC. Colorectal cancer in the young patient. *Am Surg* 1998;64:849-853.
  178. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17:271-272.
  179. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y, Nagai H. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2001;121:1300-1309.
  180. Mohar A, Frías-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora Macías T, de la Garza JG. Epidemiología Descriptiva del Cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología en México. *Salud Publica Mex* 1997;39:253-258.
  181. Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, O'Donoghue DP. Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg* 1996;83:46-50.
  182. Muller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R, Thibodeau SN, Almeida M, Edmonston TB, Boland CR, Sutter C, Jass JR, Lindblom A, Lubinski J, MacDermot K, Sanders DS, Morreau H, Müller A, Olani C, Orntoft T, Ponz De Leon M, Rosty C, Rodriguez-Bigas M, Rüschoff J, Ruszkiewicz A, Sabourin J, Salovaara R, Möslin G; ICG-HNPCC (International Collaborative Group). The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)—results of an international collaborative study. *Fam Cancer* 2001;1:87-92.
  183. Nagasaka T, Koi M, Kloor M, Gebert J, Vilkin A, Nishida N, Shin SK, Sasamoto H, Tanaka N, Matsubara N, Boland CR, Goel A. Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2008;134:1950-1960.
  184. Nelson RL, Dollear T, Freels S, Persky V. The relation of age, race, and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 80:193-197.
  185. Neri-Jiménez U. Neoplasias malignas del aparato digestivo en población derechohabiente del IMSS No 11, Nuevo Laredo, Tamaulipas. *Rev Gastroenterol Mex* 2008;73: 197-202.
  186. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75-80.
  187. Nogueira J, Huerta F, López A, Hurta H, Salazar LE, Javes EA. Guías Clínicas de diagnóstico y tratamiento del carcinoma de colon y recto. *Rev Gastroenterol Mex* 2003;68:114-117.
  188. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-28.



189. **Nugent KP, Phillips RK, Hodgson SV, Cottrell S, Smith-Ravin J, Pack K, Bodmer WF.** Phenotypic expression in familial adenomatous polyposis: partial prediction by mutation analysis. *Gut* 1994;35:1622-1623.
190. **O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Ko CY.** Are survival rates different for young and older patients with rectal cancer? *Dis Colon Rectum* 2004;47:2064-2069.
191. **O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Livingston EH, Ko CY.** Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *Am Surg* 2003;69:866-872.
192. **Oliveira C, Velho S, Domingo E, Preto A, Hofstra RM, Hamelin R, Yamamoto H, Seruca R, Schwartz S Jr.** Concomitant RASSF1A hypermethylation and KRAS/BRAF mutations occur preferentially in MSI sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 2005;24:7630-7634.
193. **Oliveira C, Velho S, Moutinho C, Ferreira A, Preto A, Domingo E, Capelinha AF, Duval A, Hamelin R, Machado JC, Schwartz Jr S, Carneiro R, Seruca R.** KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene* 2007;26:158-163.
194. **Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A, Velho S, Niessen R, Lagerstedt k, Alhopuro P, Laiho P, Veiga I, Teixeira MR, Ligtenberg M, Kleibeuker JH, Sijmons RH, Plukker JT, Imai K, Lage P, Hamelin R, Albuquerque C, Schwartz S Jr, Lindblom A, Peltomäki P, Yamamoto H, Aaltonen LA, Seruca R, Hofstra RM.** Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Genet* 2004;13:2303-2311.
195. **Organización Mundial de Gastroenterología/Guías Prácticas de la Alianza Internacional para Cáncer Digestivo: Tamizaje del cáncer colorrectal;** 2007. Disponible en: [http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/cancer\\_colorectal\\_tamizaje\\_screening\\_y\\_vigilancia.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/cancer_colorectal_tamizaje_screening_y_vigilancia.pdf).
196. **Pacheco A, Torres C, Rubio C, Silva S, Castañeda A.** Experiencia en el manejo del cancer de colon y recto en pacientes ingresados en el Hospital Regional General Ignacio Zaragoza del ISSSTE durante los años 2003-2006. *Cir Gen* 2008;30:156-160.
197. **Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD.** Mutation of a MutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-1629.
198. **Parsons HM, Tuttle TM, Kuntz KM, Begun JW, McGovern PM, Virnig BA.** Association between lymph node evaluation for colon cancer and node positivity over the past 20 years. *JAMA* 2011;306:1089-1097.
199. **Peltomäki P.** Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:735-740.
200. **Peltomäki P.** Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1174-1179.
201. **Peltomäki P, Vasen HF.** Mutations predisposing to hereditary non-polyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997;113:1146-1158.
202. **Peltomäki P, Vasen H.** Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation data-

- base. *Dis Markers* 2004;20:269-276.
203. **Pérez JJ, Martínez MA, del Castillo AL, Villalobos ML, Villalobos GM.** Estudio de 25 años del Cáncer del Aparato Digestivo en Cuatro Instituciones de la Ciudad de México. *Rev Gastroenterol Mex* 2006;71:460-472.
  204. **Perkins AS, Stern DF.** Molecular biology of cancer. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*; 5th ed. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.). Philadelphia, Lippincott Raven Publ, 1997. pp:79-102.
  205. **Pollock PM, Meltzer PS.** Lucky draw in the gene rattle. *Nature* 2002;417:906-907.
  206. **Ponz de Leon M, Marino M, Benatti P, Rossi G, Menigatti M, Pedroni M, Di Gregorio C, Losi L, Borghi F, Scarselli A, Ponti G, Roncari B, Zangardi G, Abbati G, Ascari E, Roncucci L.** Trend of incidence, subsite distribution and staging of colorectal neoplasms in the 15-year experience of a specialised cancer registry. *Ann Oncol* 2004;15:940-946.
  207. **Potocnik U, Glavac D, Golouh R, Ravnik-Glavac M.** Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary nonpolyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genet Cyto-genet* 2001;126:85-96.
  208. **Qing SH, Rao KY, Jiang HY, Wexner SD.** Racial differences in the anatomical distribution of colorectal cancer: a study of differences between American and Chinese patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:721-725.
  209. **Rabbitts TH.** Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994;372:143-149.
  210. **Raedle J, Trojan J, Brieger A, Weber N, Schäfer D, Plotz G, Staib-Sebler E, Kriener S, Lorenz M, Zeuzem S.** Bethesda guidelines: relation to microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in patients with colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2001;135:566-576.
  211. **Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE.** Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934.
  212. **Ramsoekh D, Wagner A, van Leerdam ME, Dinjens WN, Steyerberg EW, Halley DJ, Kuipers EJ, Dooijes D.** A high incidence of MSH6 mutations in Amsterdam criteria II-negative families tested in a diagnostic setting. *Gut* 2008;57:1539-1544.
  213. **Renan MJ.** How many mutations are required for tumorigenesis? Implications for human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139-146.
  214. **Ricker C, Klipfel N, Ault G, Roman L, Spicer D, Lenz HJ.** Characteristics of Lynch syndrome in 13 Hispanic families. *Hered Cancer Clin Pract* 2010;8:P19.
  215. **Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlander N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR, Clegg L, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK.** (Eds.). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. *Natl Cancer Inst* 2008. Available from: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005/results\\_merged/top\\_ic\\_survival.pdf](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/results_merged/top_ic_survival.pdf) [Accessed 06/08/2008].
  216. **Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S.** A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-1762.
  217. **Rosty C, Parry S, Young JP.** Serrated Polyposis: an enigmatic

- model of colorectal cancer predisposition. *Patholog Res Int* 2011;2011:157073.
218. Rothberg PG, Spandorfer JM, Erisman MD, Staroscik RN, Sears HF, Petersen RO, Astrin SM. Evidence that c-myc expression defines two genetically distinct forms of colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1985;52:629-632.
  219. Ruzskiewicz A, Bennett G, Moore J, Manavis J, Rudzki B, Shen L, Suthers G. Correlation of mismatch repair genes immunohistochemistry and microsatellite instability status in HNPCC-associated tumours. *Pathology* 2002;34:541-547.
  220. Ruzskiewicz AR, Jass JR. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: What, How, When, and Why? *Pathol Case Rev* 2004;9:163-172.
  221. Saltzstein SL, Behling CA. Age and time as factors in the left-to-right shift of the subsite of colorectal adenocarcinoma: a study of 213,383 cases from the California Cancer Registry. *J Clin Gastroenterol* 2007;41:173-177.
  222. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, Gruenthal K, Leppert MF, Slattery ML. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 2001; 121:830-838.
  223. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res* 2005;65:6063-6069.
  224. Sawhney MS, Farrar WD, Gudiseva S, Nelson DB, Lederle FA, Rector TS, Bond JH. Microsatellite instability in interval colon cancers. *Gastroenterology* 2006;131:1700-1705.
  225. Schmeler KM, Lynch HT, Chen LM, Munsell MF, Soliman PT, Clark MB, Daniels MS, White KG, Boyd-Rogers SG, Conrad PG, Yang KY, Rubin MM, Sun CC, Slomovitz BM, Gershenson DM, Lu KH. Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome. *N Engl J Med* 2006;354:261-269.
  226. Secretaría de Salud de México. Compendio de Cáncer/RHNM/ 2001/Morbilidad /Mortalidad. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01/rhnm-01.htm>.
  227. Shamsuddin AM, Phelps PC, Trump BF. Human large intestinal epithelium: light microscopy, histochemistry, and ultrastructure. *Hum Pathol* 1982;13:790-803. [doi:10.1016/S0046-8177(82)80075-0].
  228. Sharma SG, Gulley ML. BRAF mutation testing in colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134:1225-1228.
  229. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-791.
  230. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JP. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:18654-18659. Online at [www.pnas.org/cgi/content/full](http://www.pnas.org/cgi/content/full)
  231. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008;10:293-300.
  232. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, Gerald WL, Ellis NA. Value of immunohistochemical detection of

- DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2005;29:96-104.
233. **Shia J, Tang LH, Vakiani E, Guillem JG, Stadler ZK, Soslow RA, Katabi N, Weiser MR, Paty PB, Temple LK, Nash GM, Wong WD, Offit K, Klimstra DS.** Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1639-1645.
  234. **De Silva MV, Fernando MS, Fernando D.** Comparison of some clinical and histological features of colorectal carcinoma occurring in patients below and above 40 years. *Ceylon Med J* 2000;45:166-168.
  235. **Skinner SA, O'Brien PE.** The microvascular structure of the normal colon in rats and humans. *J Surg Res* 1996;61:482-490. [doi:10.1006/jsre.1996.0151].
  236. **Skuse GR, Ludlow JW.** Tumor suppressor genes in disease and therapy. *Lancet* 1995;345:902-906.
  237. **South CD, Yearsley M, Martin E, Arnold M, Frankel W, Hampel H.** Immunohistochemistry staining for the mismatch repair proteins in the clinical care of patients with colorectal cancer. *Genet Med* 2009; 11:812-817.
  238. **Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B.** Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993;75:951-957.
  239. **Sporn MB.** The war on cancer. *Lancet* 1996;347:1377-1381.
  240. **Spunt S, Furman W, La Quaglia M, Bondy M, Goldberg R.** Colon and rectal cancer. In: *Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age, Including SEER Incidence and Survival: 1975-2000*. Bleyer A, O'Leary M, Barr R, Ries LAG (eds). Chapter 10. National Cancer Institute, NIH Pub. No. 06-5767. Bethesda, MD 2006. pp:122-133.
  241. **Stahl J.** Mismatch repair proteins and microsatellites hit clinical practice. *Adv Anat Pathol* 2000;7:85-93.
  242. **Stang A, Stabenow R, Stegmaier C, Eisinger B, Bischof-Hammes E, Jöckel KH.** Unexplained inversion of the incidence ratio of colon and rectal cancer among men in East Germany. A time trend analysis including 147,790 cases. *Eur J Epidemiol* 2007;22:245-255.
  243. **Stefanidis D, Pollock BH, Miranda J, Wong A, Sharkey FE, Rousseau DL, Thomas CR Jr, Kahlenberg MS.** Colorectal cancer in Hispanics: a population at rRisk for earlier onset, advanced disease, and decreased survival. *Am J Clin Oncol* 2006;29:123-126.
  244. **Stetler-Stevenson WG.** Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999;103: 1237-1241.
  245. **Stigliano V, Assisi D, Cosimelli M, Palmirotta R, Giannarelli D, Mottolese M, Mete LS, Mancini R, Casale V.** Survival of hereditary non-polyposis colorectal cancer patients compared with sporadic colorectal cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:39. [doi:10.1186/1756-9966].
  246. **Stormorken AT, Bowitz-Lothe IM, Norèn T, Kure E, Aase S, Wijnen J, Apold J, Heimdal K, Møller P.** Immunohistochemistry identifies carriers of mismatch repair gene defects causing hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:4705-4712.
  247. **Stupart DA, Goldberg PA, Algar U,**

- Ramesar R. Surveillance colonoscopy improves survival in a cohort of subjects with a single mismatch repair gene mutation. *Colorectal Dis* 2009;11:126-130.
248. Suzuki H, Waktins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004;36:417-422.
249. Svensson E, Grotmol T, Hoff G, Langmark F, Norstein J, Tretli S. Trends in colorectal cancer incidence in Norway by gender and anatomic site: an age-period-cohort analysis. *Eur J Cancer Prev* 2002;11:489-495.
250. Taketo MM. Shutting down Wnt signal-activated cancer. *Nat Genet* 2004;36:320-322.
251. Talbäck M, Stenbeck M, Rosén M, Barlow L, Glimelius B. Cancer survival in Sweden 1960-1998—developments across four decades. *Acta Oncol* 2003;42:637-659.
252. Talbot IC, Burt R, Järvinen H, Thomas G (2000). Familial adenomatous polyposis. In: Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System. Hamilton SR, Aaltonen LA (eds). World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France, IARC Press, 2000. pp:120-5.
253. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, Moslein G, Baker SM, Liskay RM, Burgart LJ, Honchel R, Halling KC. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996;56:4836-4840.
254. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-8686.
255. Troisi RJ, Freedman AN, Devesa SS. Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer* 1999;85:1670-1676.
256. Tuppurainen K, Mäkinen JM, Junttila O, Liakka A, Kyllönen AP, Tuominen H, Karttunen TJ, Mäkinen MJ. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J Pathol* 2005;207:285-294.
257. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261-268.
258. Urbanski SJ, Kossakowska AE, Marcon N, Bruce WR. Mixed hyperplastic adenomatous polyps - an underdiagnosed entity. Report of a case of adenocarcinoma arising within a mixed hyperplastic adenomatous polyp. *Am J Surg Pathol* 1984;8:551-556.
259. Vaish M. Mismatch repair deficiencies transforming stem cells into cancer stem cells and therapeutic implications. *Mol Cancer* 2007;6:26-34.
260. Valdovinos Diaz MA, Guerrero C, Nava AA, Jacobo J, Villalobos JJ. The biological behavior of colorectal carcinoma in young patients. *Rev Gastroenterol Mex* 1991;56:55-60.
261. van Lier MG, Wagner A, van Leerdam ME, Biermann K, Kuipers EJ, Steyerberg, EW, Dubbink HJ,

- Dinjens WN. A review on the molecular diagnostics of Lynch syndrome: a central role for the pathology laboratory. *J Cell Mol Med* 2010;14:181-197.
262. Varner JA, Cheresh DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:724-730.
263. Vasen HF, Boland CR. Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome. *JAMA* 2005;293:2028-2030.
264. Vasen HF, Möslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Møller P, Nagengast F, Parc Y, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Wijnen J. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 2007;44:353-362.
265. Vasen HF, Stormorken A, Menko FH, Nagengast FM, Kleibeuker JH, Griffioen G, Taal BG, Moller P, Wijnen JT. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J Clin Oncol* 2001;19:4074-4080.
266. Vilches N, Luévano A, Barboza O, Garza R, Ancer J, Flores JP. Carcinoma colorrectal: comparación histopatológica entre pacientes mayores y menores de 51 años. *Patología* 2010;48:12-17.
267. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003;63:5209-5212.
268. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677-685.
269. Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC, Colditz GA. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer* 2004;108:433-442.
270. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323-330.
271. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet* 2006;38:787-793.
272. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989;9:3088-3092.
273. Wu Y, Berends MJ, Post JG, Mensink RG, Verlind E, Van Der Sluis T, Kempinga C, Sijmons RH, van der Zee AG, Hollema H, Kleibeuker JH, Buys CH, Hofstra RM. Germline mutations of EXO1 gene in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and atypical HNPCC forms. *Gastroenterology* 2001;120:1580-1587.
274. Wu Y, Berends MJ, Sijmons RH, Mensink RG, Verlind E, Kooi KA, van der Sluis T, Kempinga C, van der Zee AG, Hollema H, Buys CH, Kleibeuker JH, Hofstra RM. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 2001;29:137-138.
275. Yang Q, Zhang R, Wang XW, Linke SP, Sengupta S, Hickson ID,

- Pedrazzi G, Perrera C, Stagliar I, Littman SJ, Modrich P, Harris CC. The mismatch DNA repair heterodimer, hMSH2/6, regulates BLM helicase. *Oncogene* 2004;23:3749-3756.
276. Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, Rennert H, Pirog EC, Banner BF, Chen YT. Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2009;33:572-582.
277. Yearsley M, Hampel H, Lehman A, Nakagawa H, de la Chapelle A, Frankel WL. Histologic features distinguish microsatellite-high from microsatellite-low and microsatellite-stable colorectal carcinomas, but do not differentiate germline mutations from methylation of the MLH1 promoter. *Hum Pathol* 2006;37:831-838.
278. Yuen ST, Chan TL, Ho JW, Chan AS, Chung LP, Lam PW, Tse CW, Wyllie AH, Leung SY. Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002;21:7585-7592.
279. Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Tsui WW, Chan AS, Futreal A, Stratton MR, Wooster R, Leung SY. Similarity of the phenotypic patterns associated with *BRAF* and *KRAS* mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002;62:6451-6455.
280. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001;15:2343-2360.